

L'ARBRE VASCULAIRE: FORMATIONS ET ASPECTS THÉRAPEUTIQUES

Jean-Sébastien Silvestre

Inserm UMRS 970, Paris Cardiovascular Research Center,
Paris, France

<http://silvestrelab.weebly.com>

jean-sebastien.silvestre@inserm.fr



-|-

Généralités-Principaux acteurs

✓Modifications quantitatives:

Vasculogenèse: migration, prolifération, différenciation des cellules progénitrices endothéliales pour former des cellules endothéliales qui s'associent entre elles pour donner des tubes endothéliaux (Réseau capillaire primitif)

Angiogenèse: croissance, extension du réseau capillaire pré-existant

Artériogenèse: épaissement pariétal (MEC), migration, prolifération, différenciation des cellules progénitrices vasculaires pour former des CML et générer un vaisseau de type artériole

✓Modifications qualitatives:

Spécification artérioveineuse

Spécification lymphatique

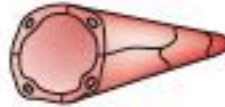
Adaptation à l'environnement tissulaire

Remodelage artériel: modification de la structure du vaisseau (diamètre du vaisseau et épaisseur de la paroi artérielle) en réponse à un stimulus (augmentation du débit sanguin, exercice musculaire, sténose...)

Les différents composants de l'arbre vasculaire

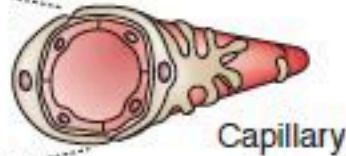
1- Tube endothélial

EC tube



2- Capillaire

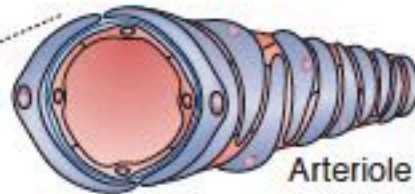
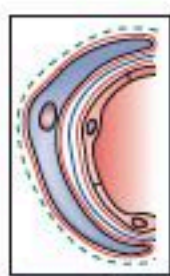
EC tube
PCs
BM



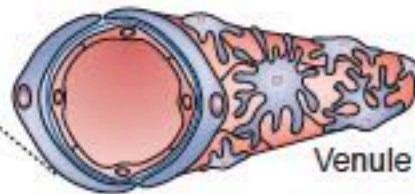
Capillaire

3- Artériole/Veinule

EC tube
IEL
SMCs
BM
EEL



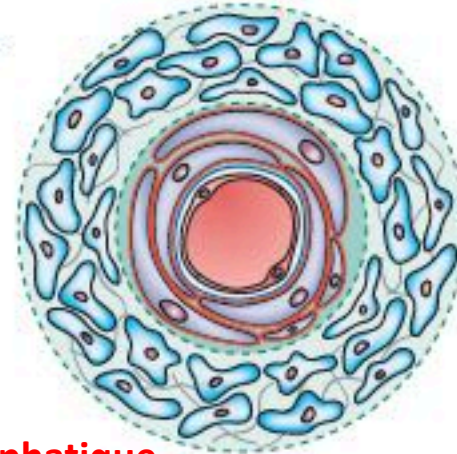
Artériole



Venule

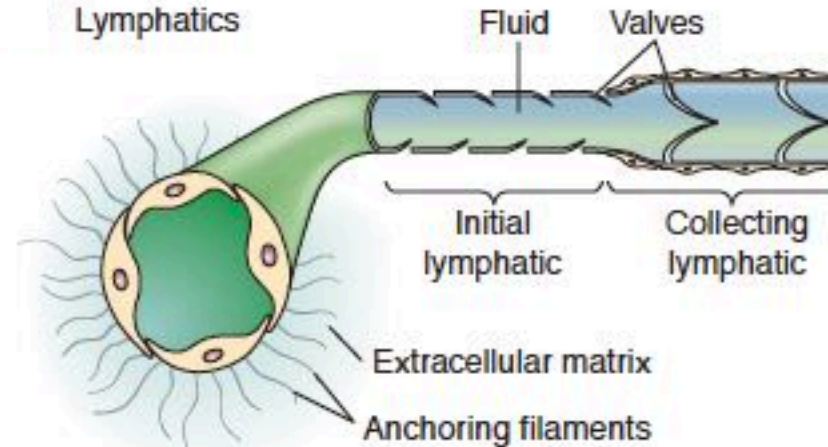
4- Artère

EC tube
IEL
SMCs
EEL
FBs
EM
EEL



5- Lymphatique

Lymphatics



	Endothelial cell (EC)		Internal elastic lamina (IEL)
	Pericyte (PC)		External elastic lamina (EEL)
	Smooth muscle cell (SMC)		Basement membrane (BM)
	Fibroblast (FB)		Lymphatic endothelial cell
			Extracellular matrix (EM)



2- Les principaux acteurs

√ Différents membres

Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF-A

VEGF-B

VEGF-C

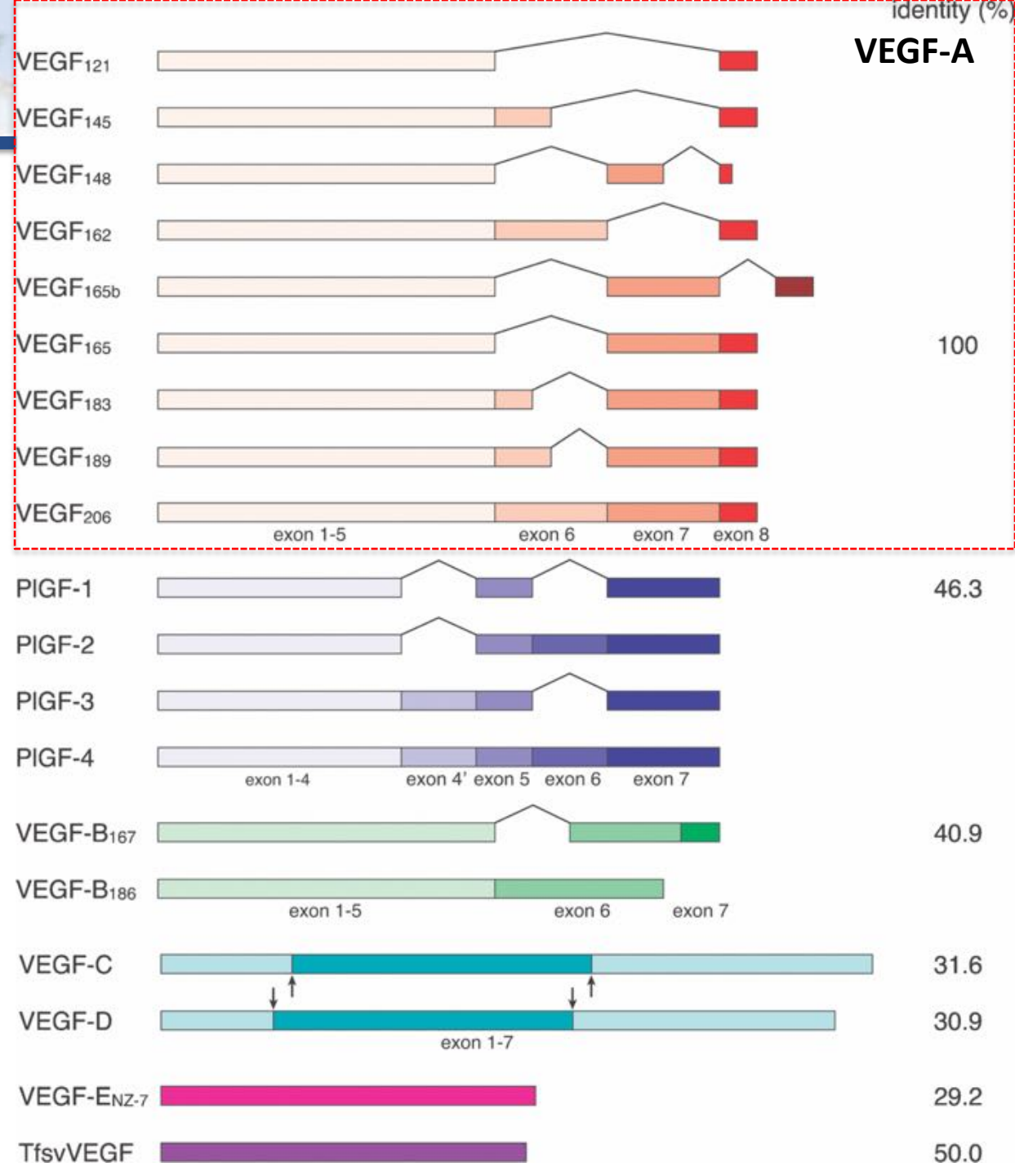
VEGF-D

VEGF-E

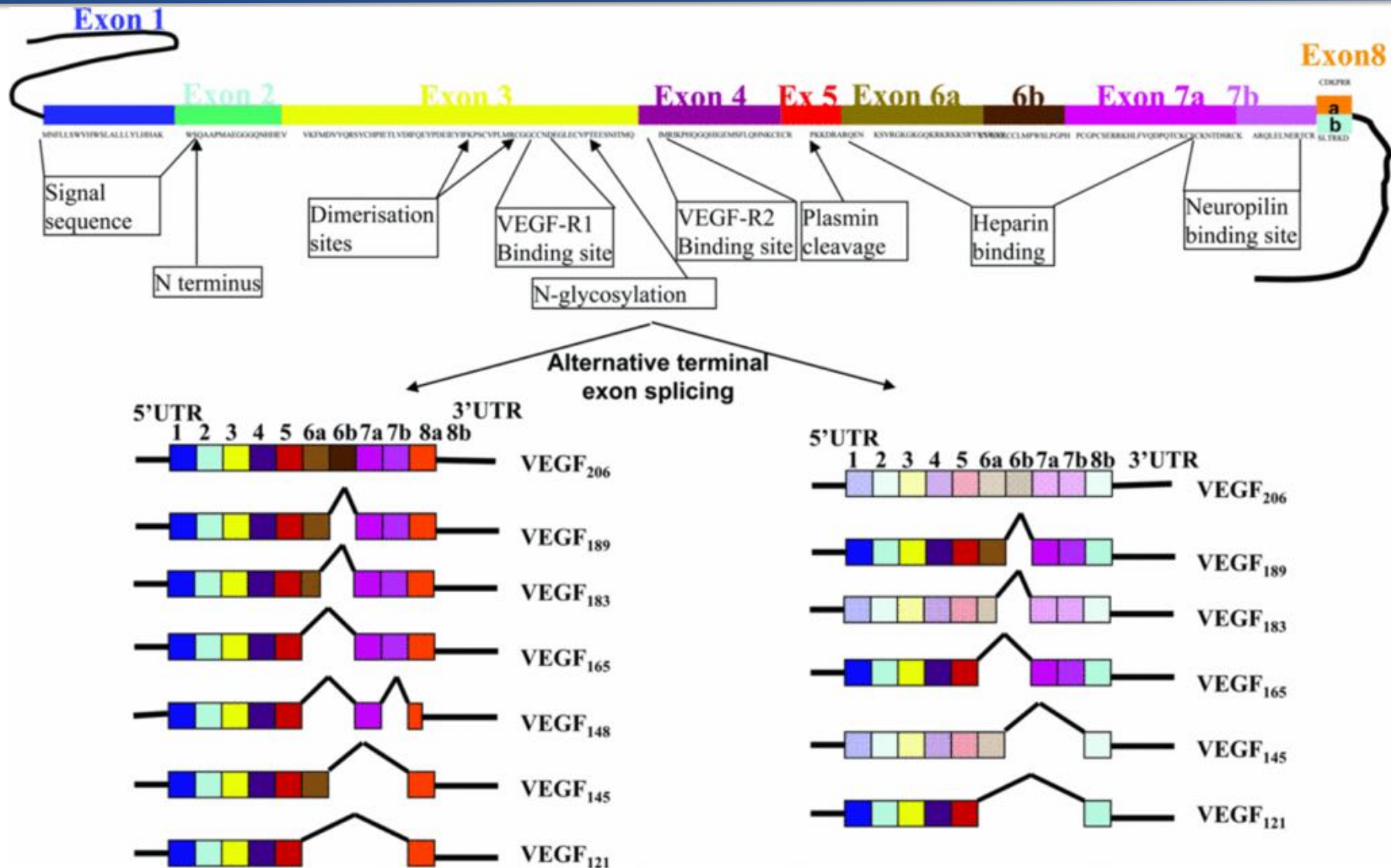
Placenta Growth Factor

PlGF

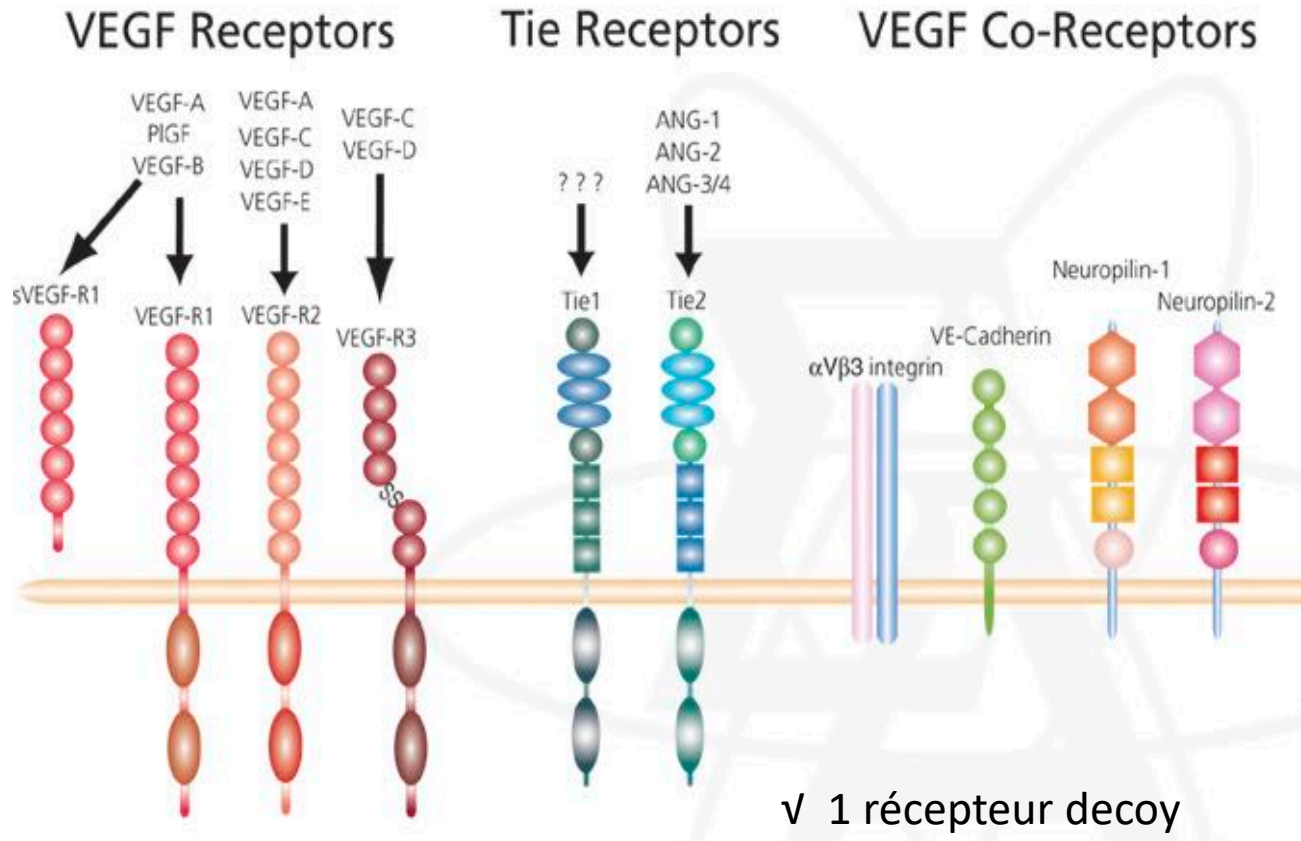
√ Pour certains membres, différentes isoformes



Les différents membres de la famille des VEGFs



VEGF-A165b: anti-angiogénique (Kikuchi R, Nat Med, 2014)!!

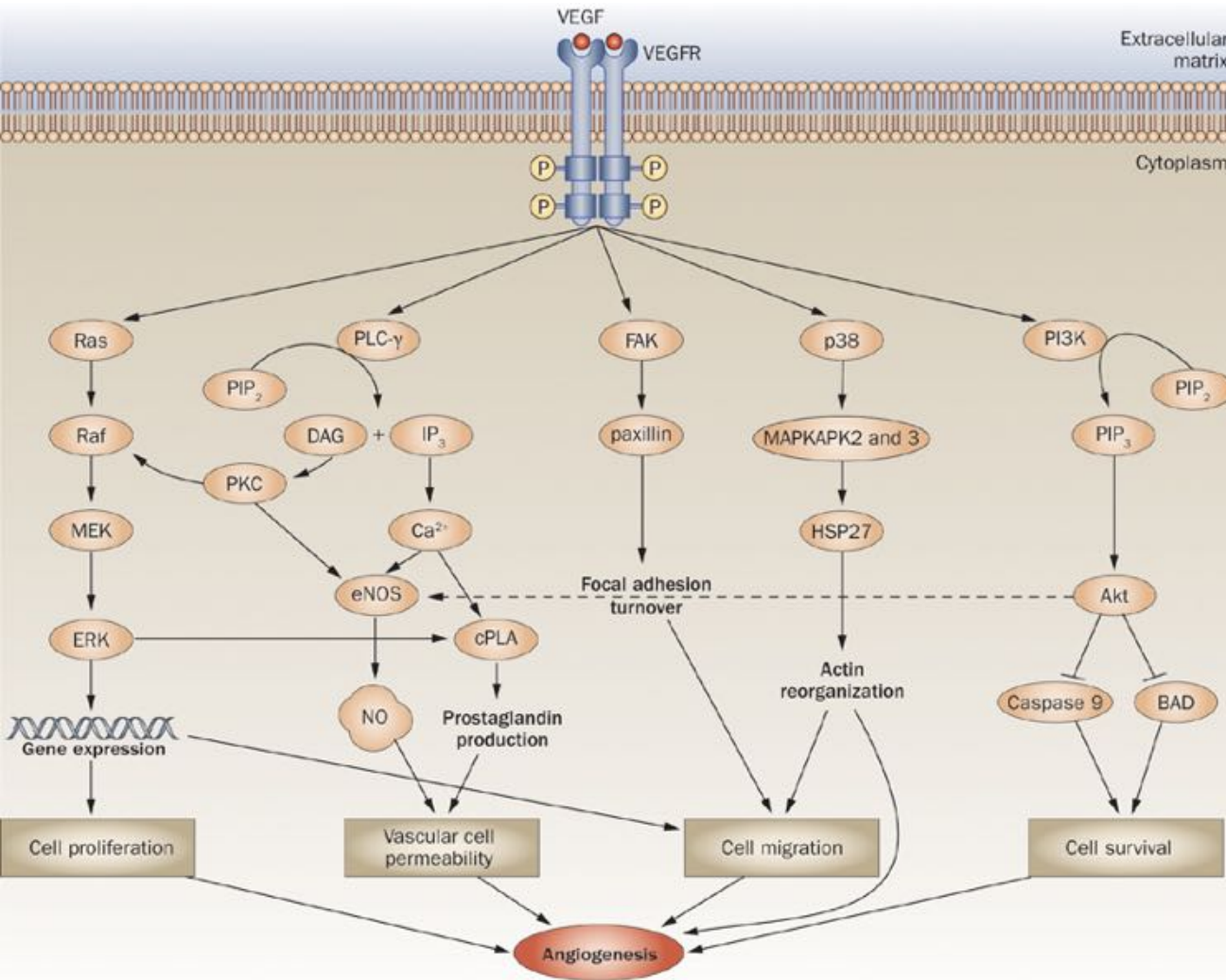


✓ 3 récepteurs principaux
VEGFR1
VEGFR2
VEGFR3

✓ 1 récepteur decoy
sVEGFR1

✓ Co-récepteurs
Neuropiline
VE-Cadherin
AlphaVbeta3-Integrin

✓ Co-activateurs
ANG1&2/TIE1&2



3 voies de signalisation principales

- Ras
- PLC-γ (Phospholipase C- γ)
- PI3-Kinase (Phosphoinositol 3-Kinase)

Effets cellulaires principaux

- √ MAPK – Prolifération
- √ p38/MAPK/eNOS- Perméabilité
- √ HSP27- Migration, remodelage actine
- √ PI3K/AKT- Survie cellulaire

Les différents membres de la famille des FGFs

Fibroblast growth factor

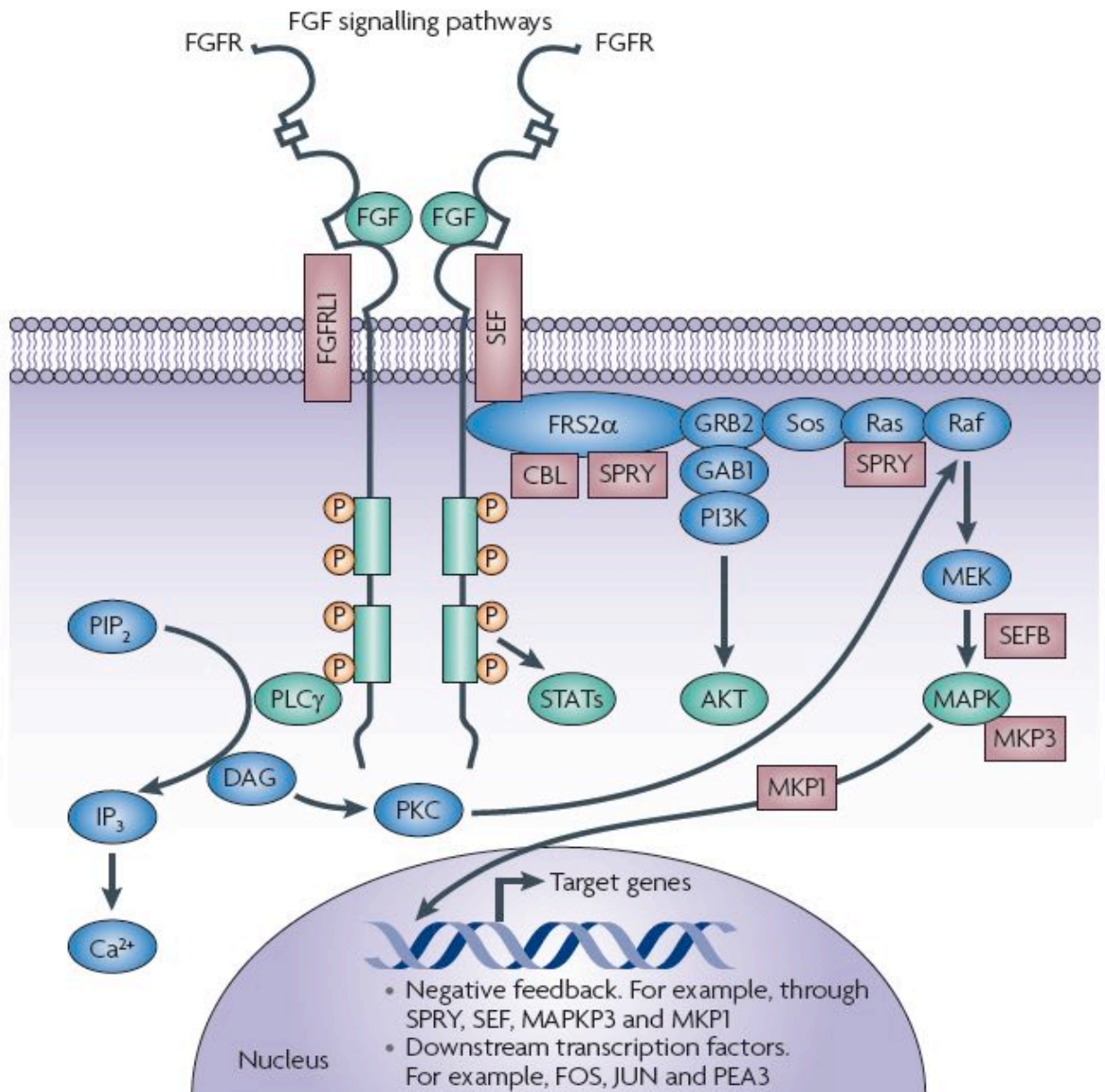
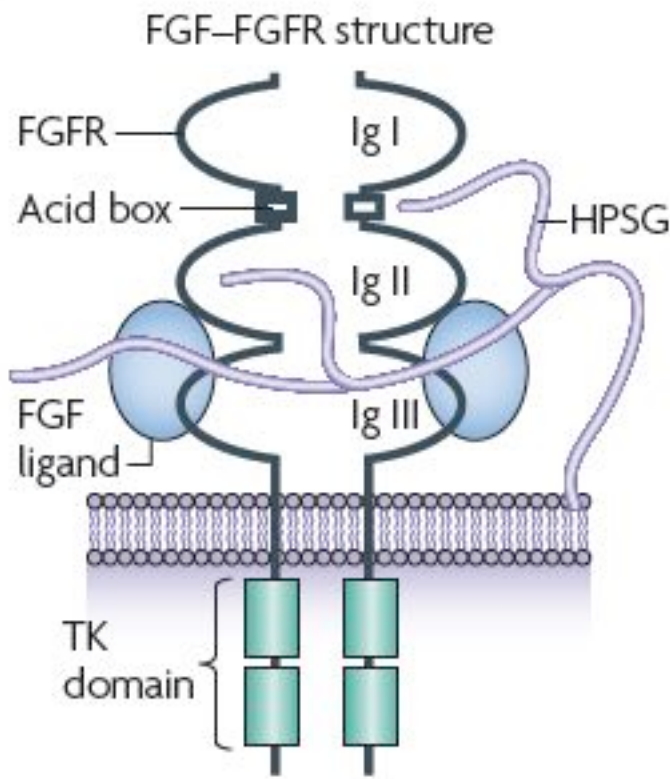
18 ligands (FGF-1, 2)

4 récepteurs

FGFR1, FGFR2

FGFR3, FGFR4

FGFR5 (FGFRL1, no tyrK)



Les différents membres de la famille des PDGFs

Platelet-derived growth factor

4 membres

PDGF-AA

PDGF-BB

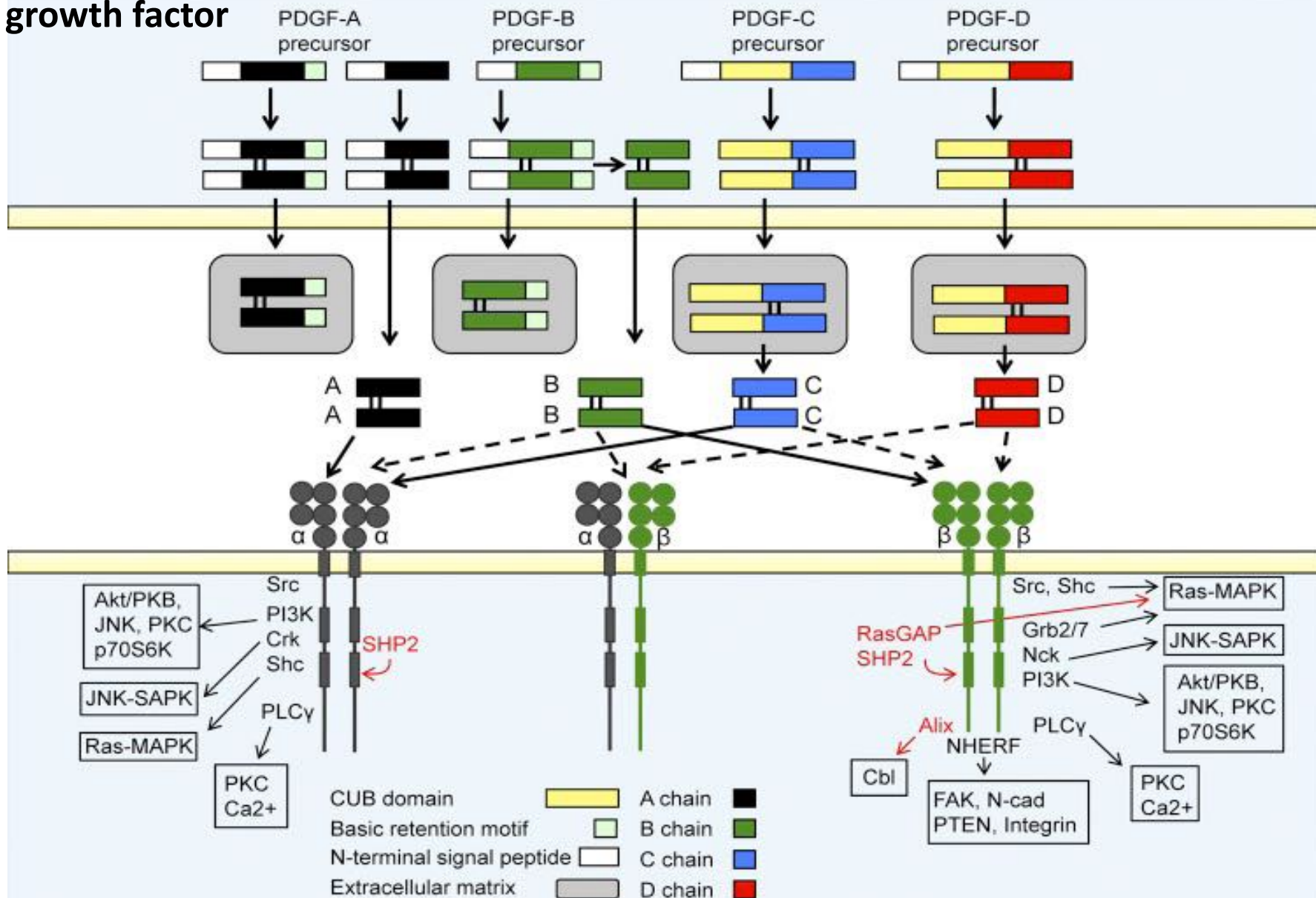
PDGF-CC

PDGF-DD

2 récepteurs:

PDGF-R α

PDGF-R β



Les différents membres de la famille des TGF β

Transforming growth factor β

3 membres

TGF β 1

TGF β 2

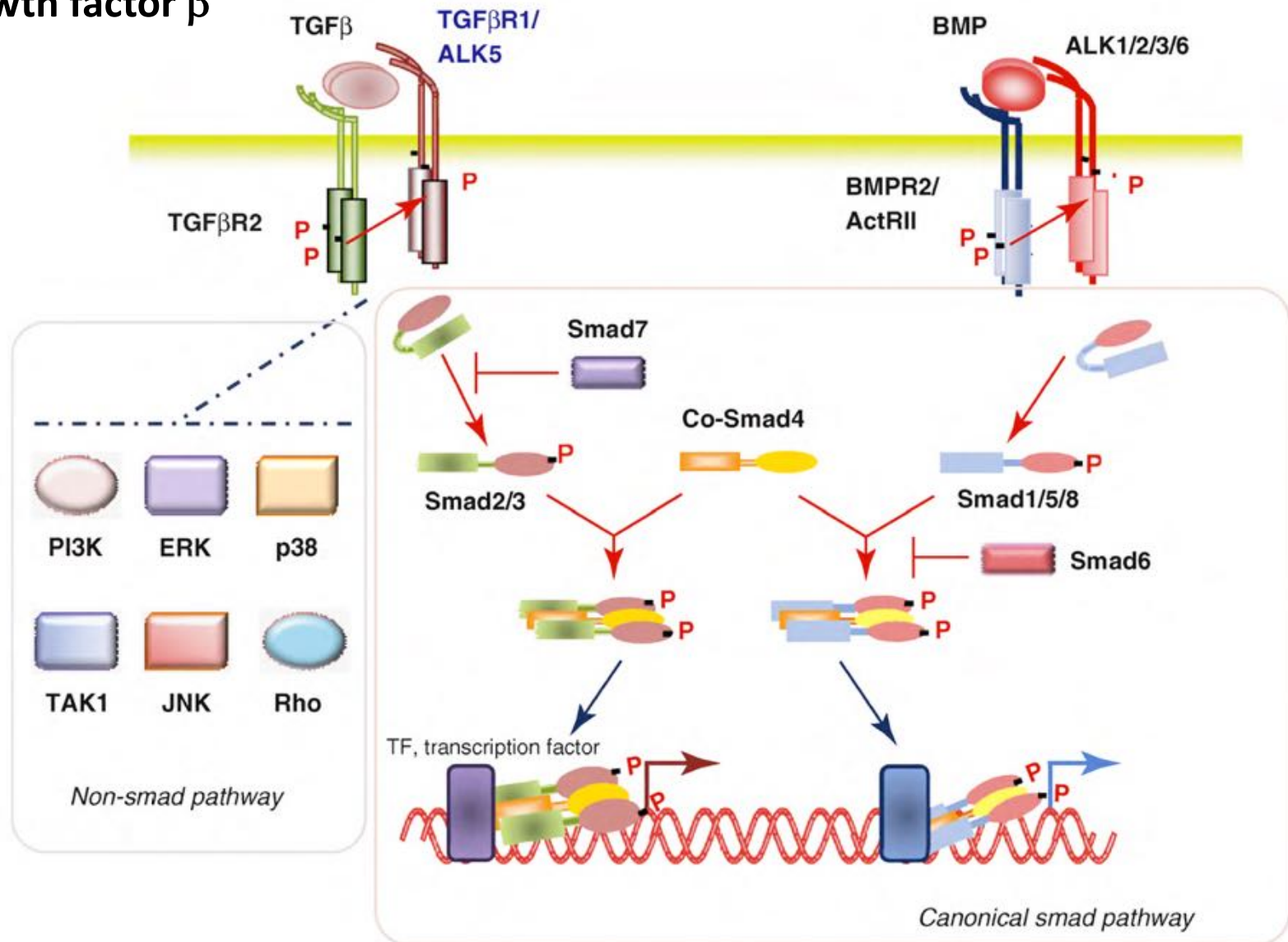
TGF β 3

3 récepteurs

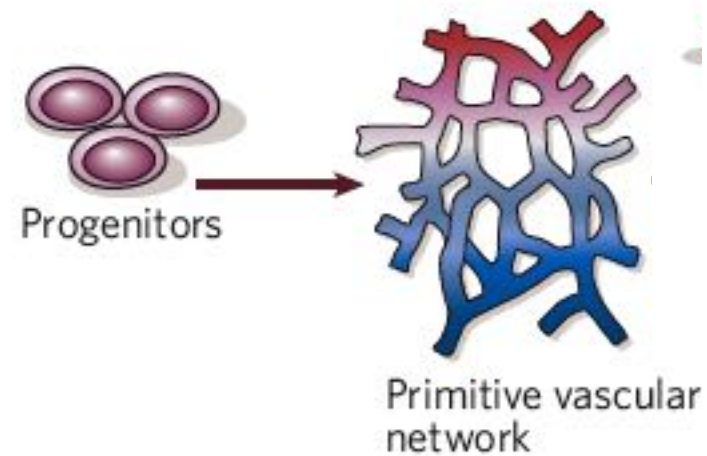
RI

RII

RIII



-II- VASCULOGENESE

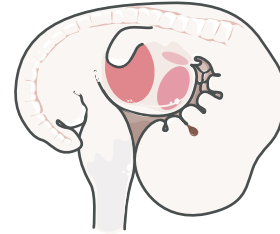


Cellules souches totipotentes = cellules souches du stade fertilisé au stade 8 cellules. Elles peuvent se différencier en tous les types de cellules embryonnaires et extra-embryonnaires et construire un organisme complet et viable.

Cellules souches pluripotentes = Elles peuvent donner des cellules dérivées de l'une des trois couches germinales (endoderme, ectoderme et mésoderme). La pluripotence est une propriété des cellules qui se trouvent dans la masse cellulaire interne du blastocyste en développement. La pluripotence in vivo et in vitro est régie par une trinité de régulateurs nucléaires, Oct4, Sox2 et Nanog.

Cellules souches multipotentes = Elles peuvent donner différents types de cellules, mais seulement celles issues d'une lignée cellulaire spécifique.

Cellules souches unipotentes = Elles peuvent se différencier en un seul type de cellules, mais elles peuvent aussi s'auto-renouveler comme toutes les cellules souches et doivent être distinguées des cellules non souches.



Cellules souches pluripotentes
Cellules souches multipotentes

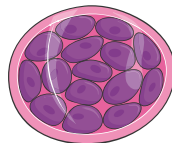
Reprogrammation



Différenciation



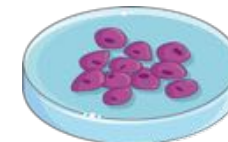
Cellules différenciées



Transdifférenciation



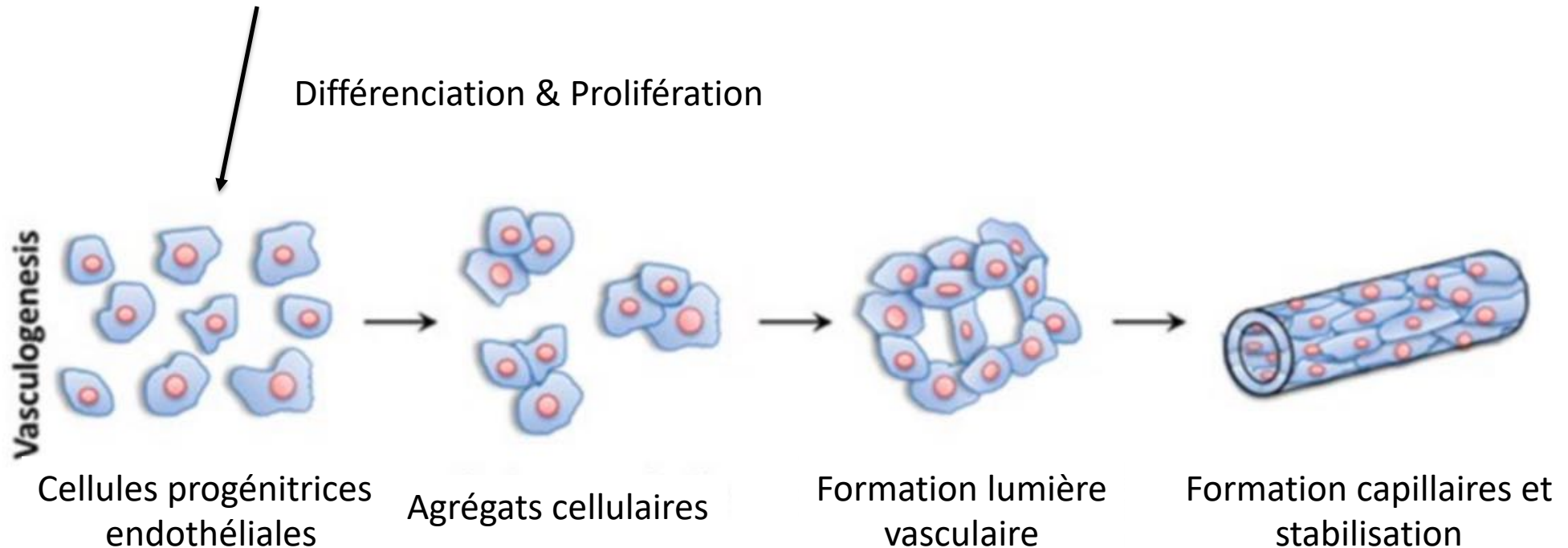
Cellules différenciées

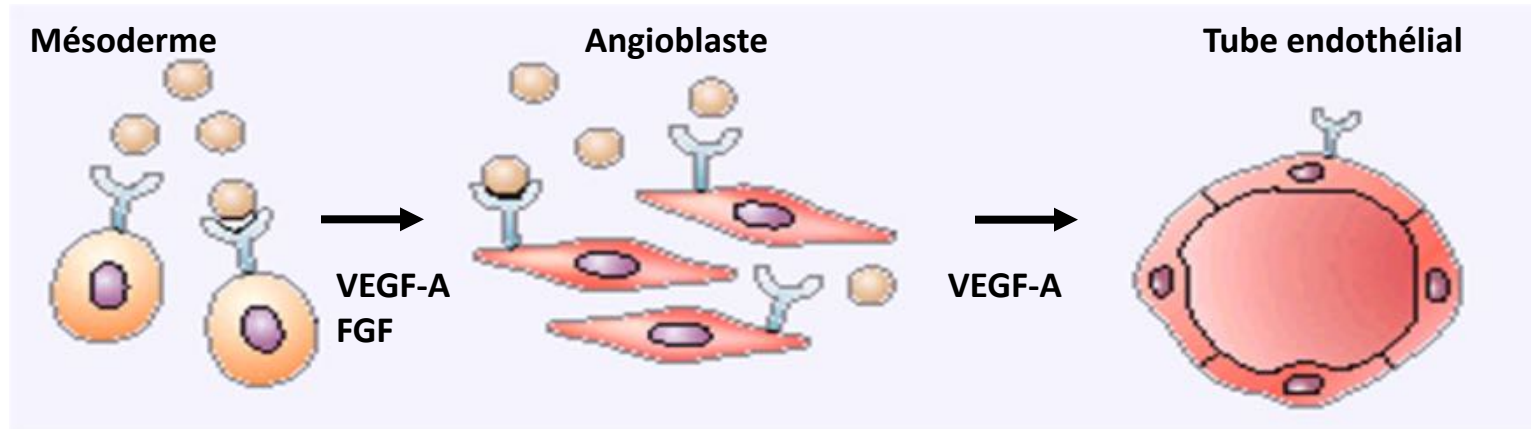


Angioblastes (cellules souches endothéliales)

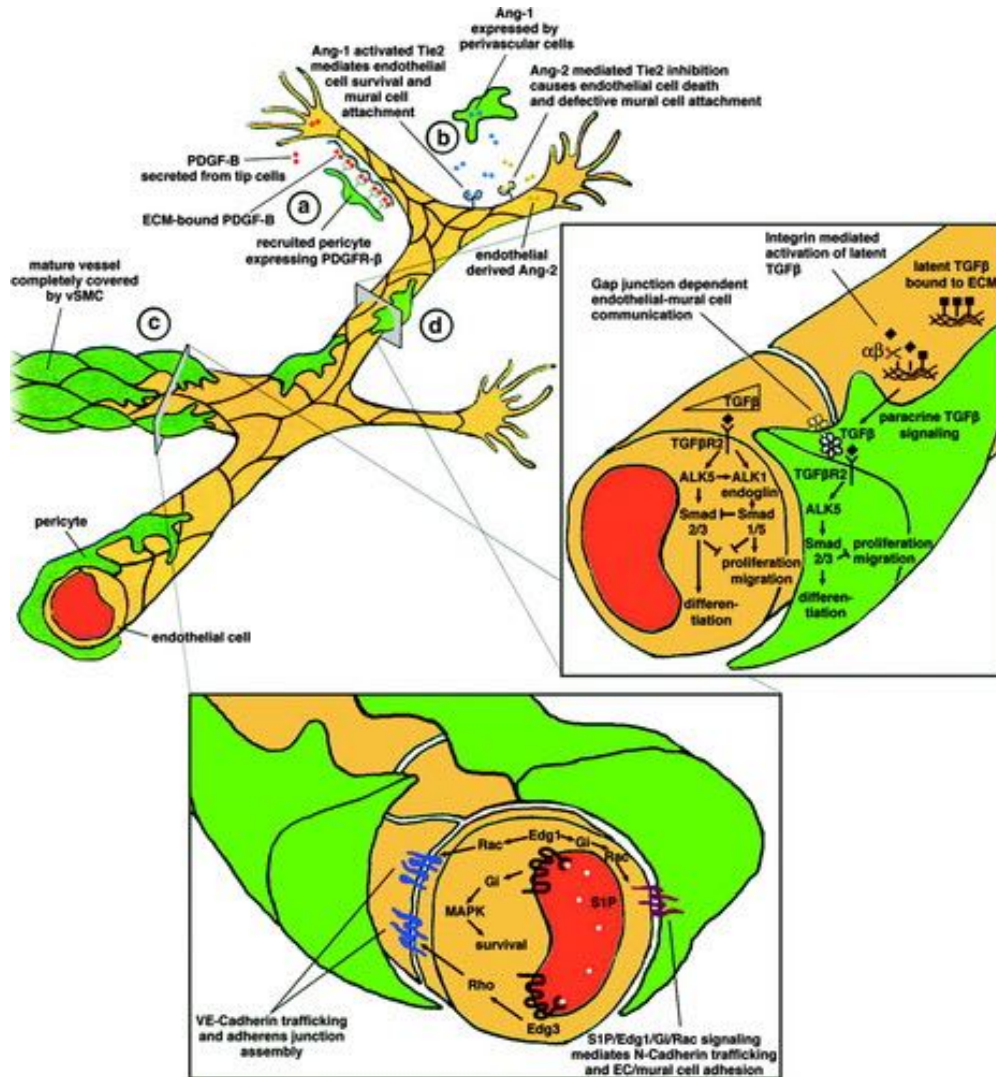
Embryon: Mésoderme

Tissu adulte: Niche tissulaire, moelle osseuse, paroi vasculaire etc...





- Les angioblastes (cellules souches endothéliales) prolifèrent et se différencient en cellules progénitrices endothéliales (Early & Late EPCs) puis en cellules endothéliales qui vont tapisser la lumière vasculaire
- **Les cellules endothéliales primaires (non spécialisées)** forment des tubes qui vont ensuite s'associer pour générer un réseau capillaire primitif (plexus)

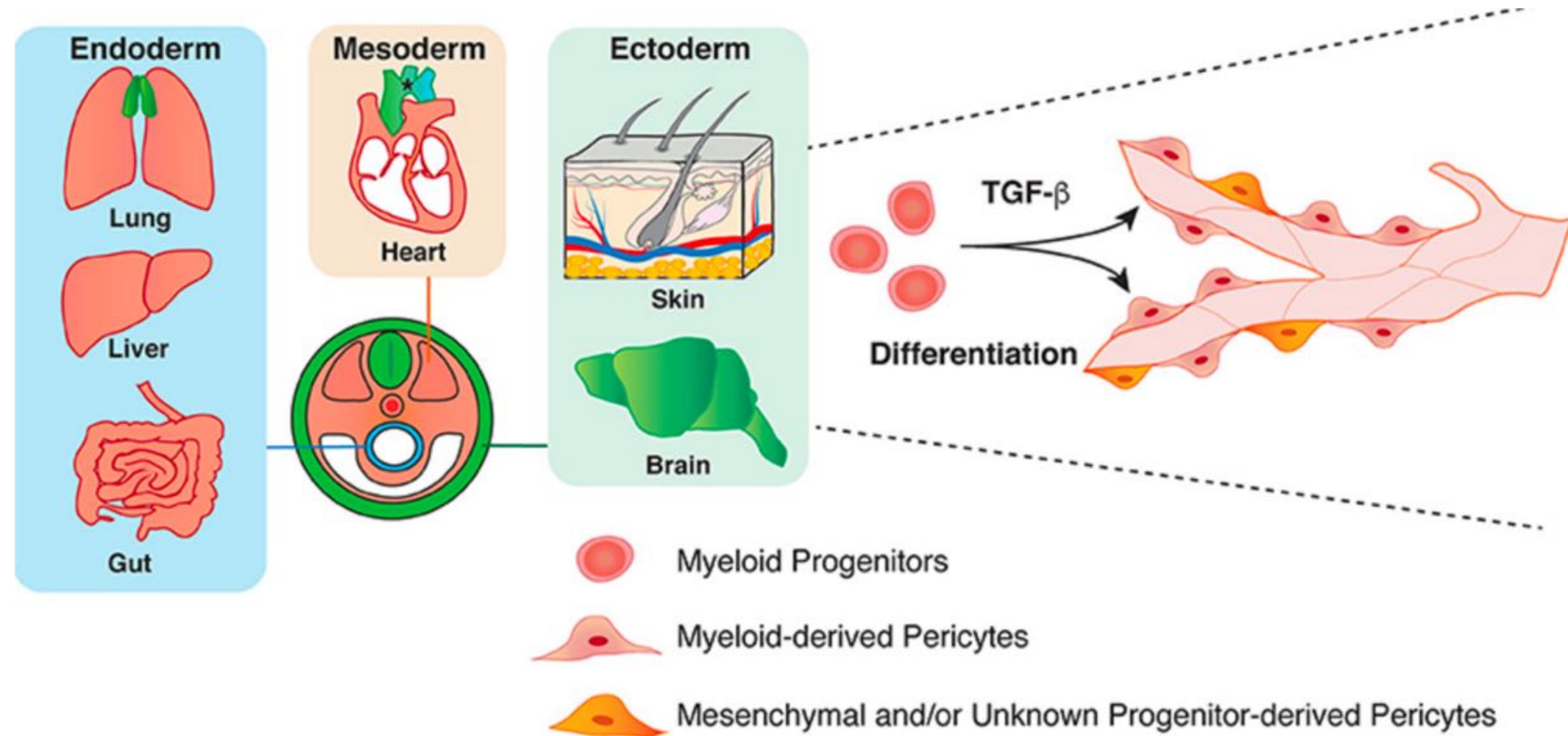


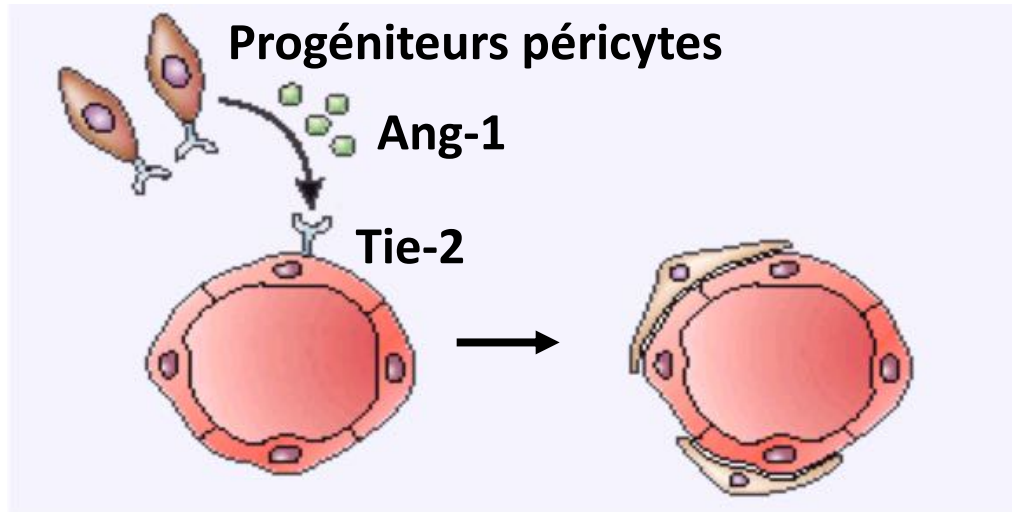
Tous les vaisseaux sanguins sont composés de deux types de cellules distinctes : les cellules endothéliales et les cellules murales. Alors que les cellules endothéliales forment la paroi interne du vaisseau, les cellules murales s'associent au tube endothélial et le recouvrent. Selon leur densité, leur morphologie, leur emplacement et l'expression de marqueurs spécifiques, les cellules murales sont généralement subdivisées en cellules musculaires lisses vasculaires et péricytes.

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont associées aux artères et aux veines autour desquelles elles forment de multiples couches concentriques.

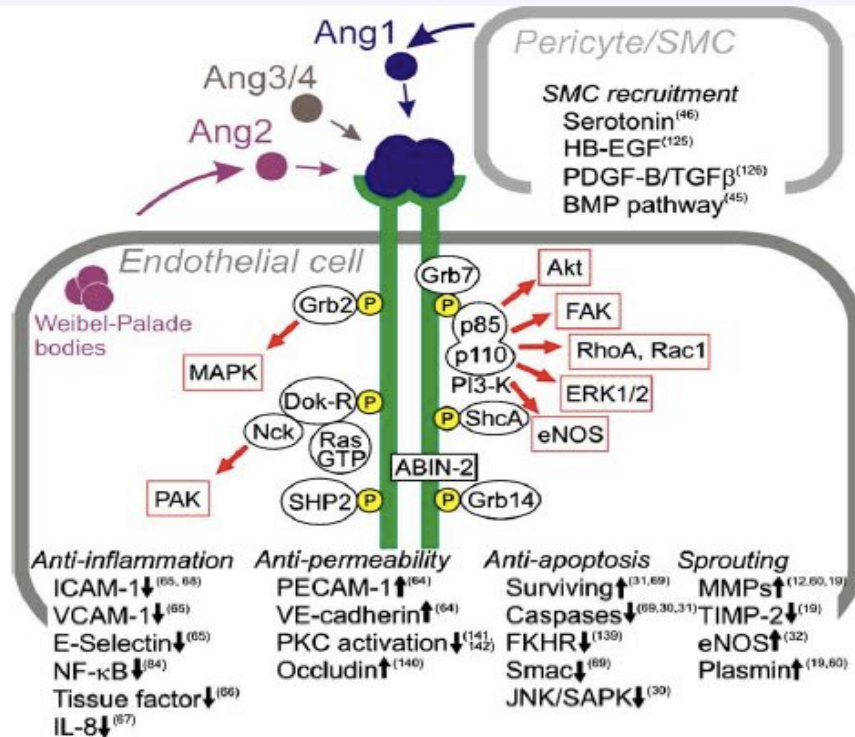
Les péricytes sont associés aux vaisseaux sanguins de plus petit diamètre (artérioles, capillaires et veinules) et partagent leur membrane basale avec l'endothélium.

Maturation des capillaires: le rôle des péricytes

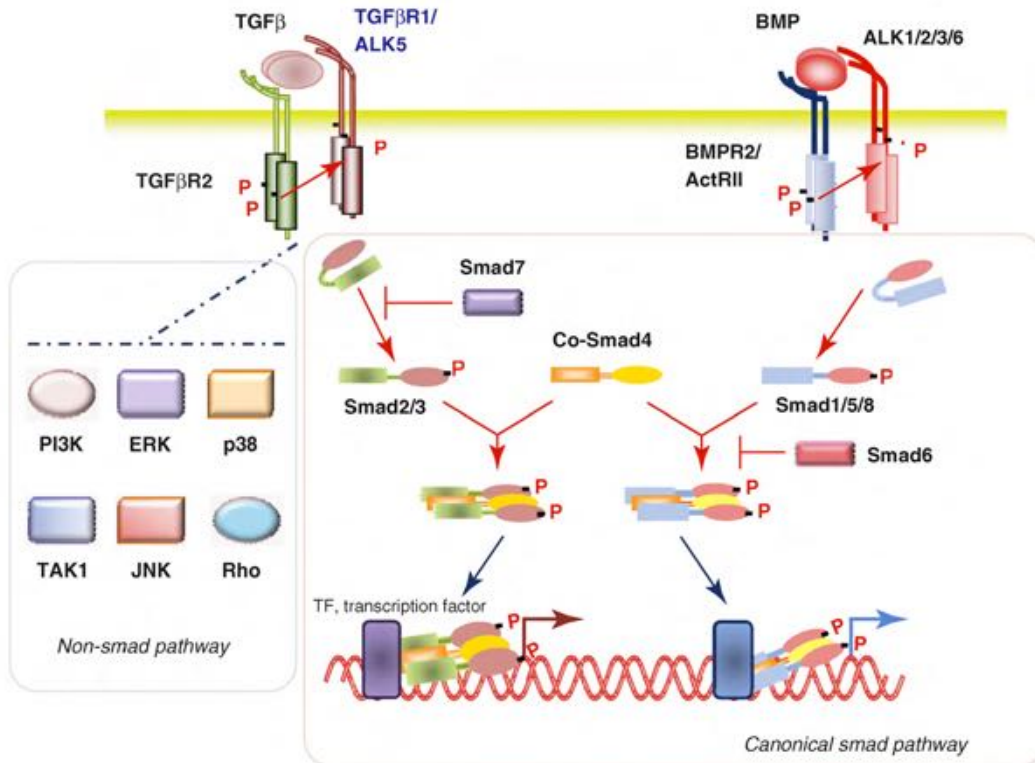
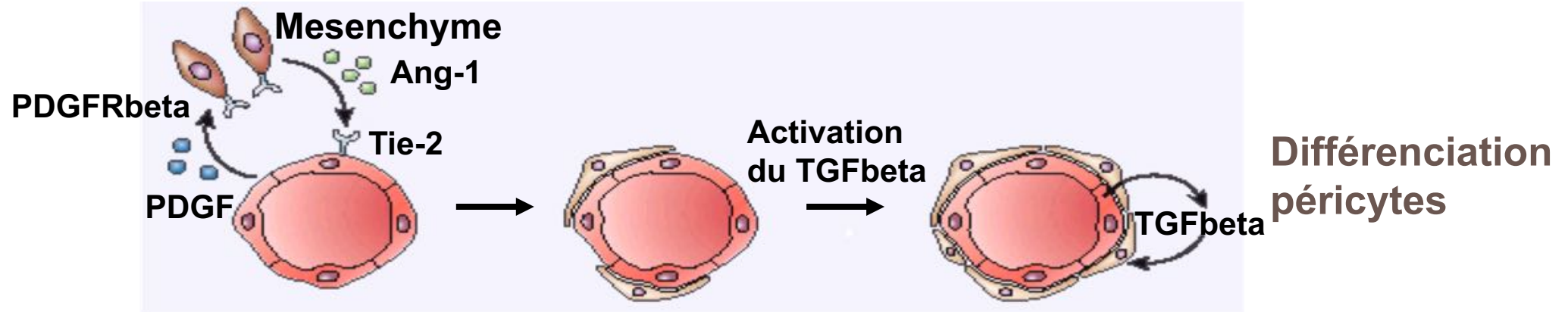




Recrutement des progéniteurs des cellules murales

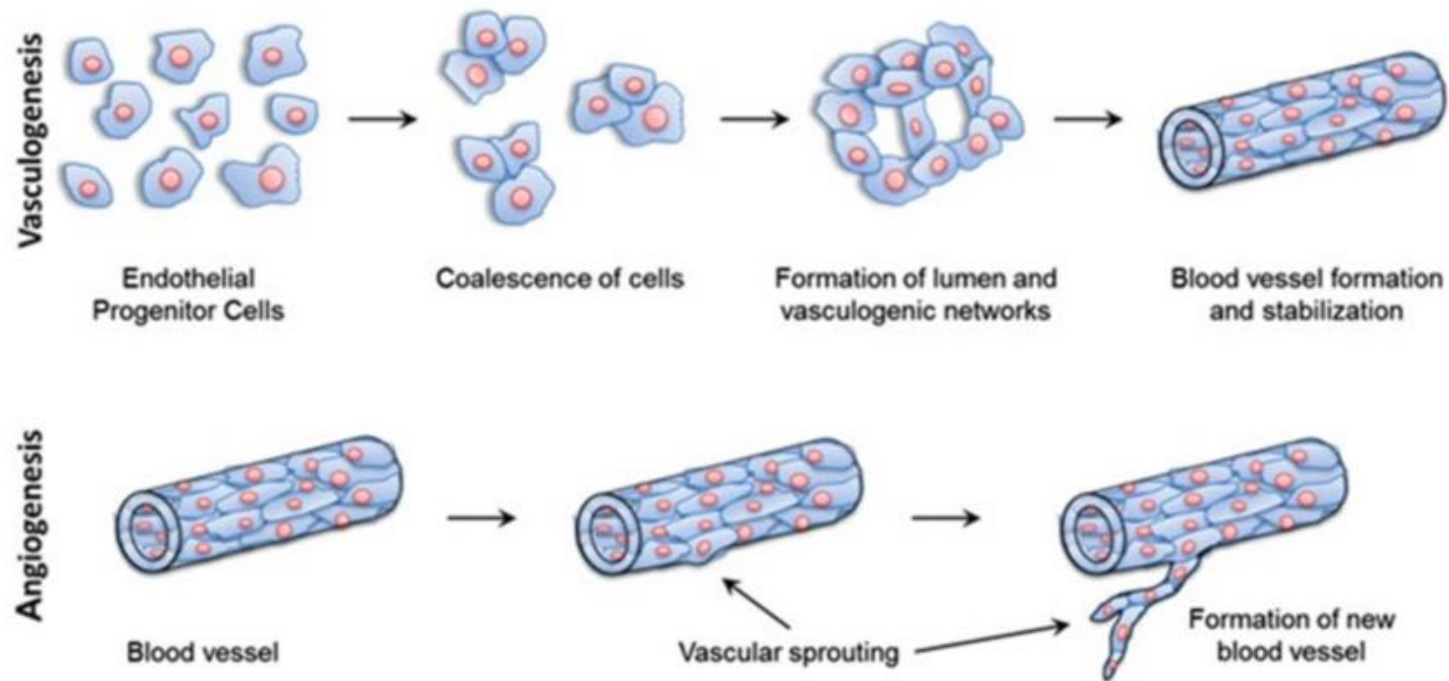


Les angiopoïétines et leurs récepteurs TIE

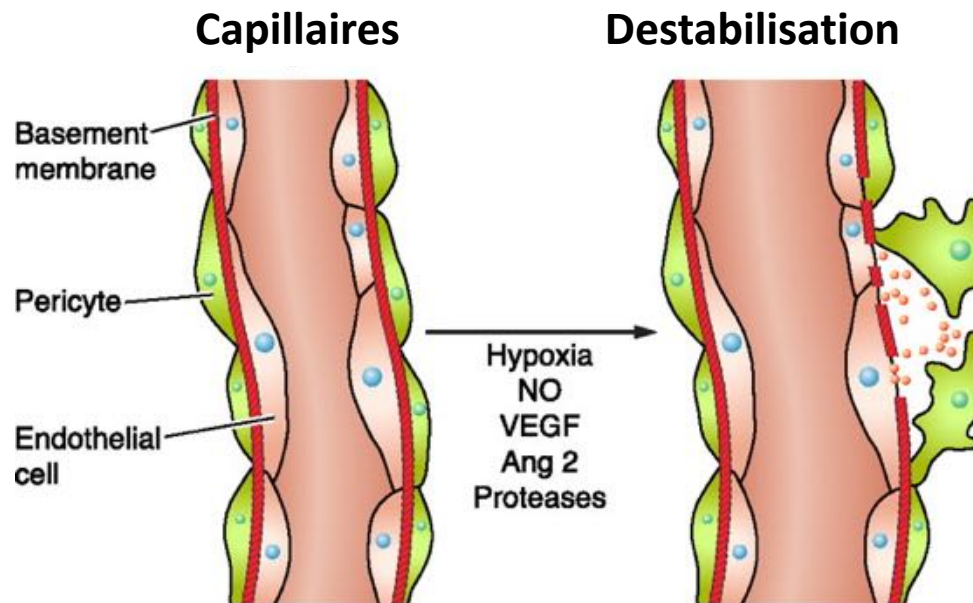


TGFbeta et ses récepteurs

-III- ANGIOGENESE



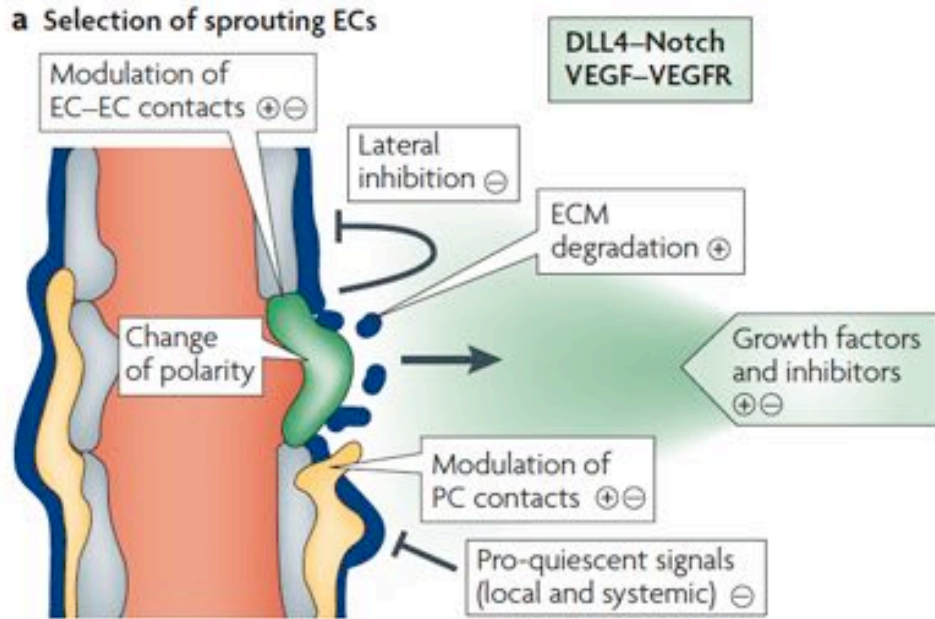
- Destabilisation de la paroi vasculaire
- Dégradation de la matrice extracellulaire
- Bourgeonnement et/ou intussusception
- Prolifération/migration cellules endothéliales
- Perfusion et stabilisation de la paroi vasculaire



**C endo maintenues
quiescentes par mb basale**

Détachement des péricytes

**Dégradation mb basale et
exposition des c endo au
collagène 1 = phénotype activable**



Trois types de cellules endothéliales:

✓ Tip Cells – migration

✓ Stalk Cells – prolifération

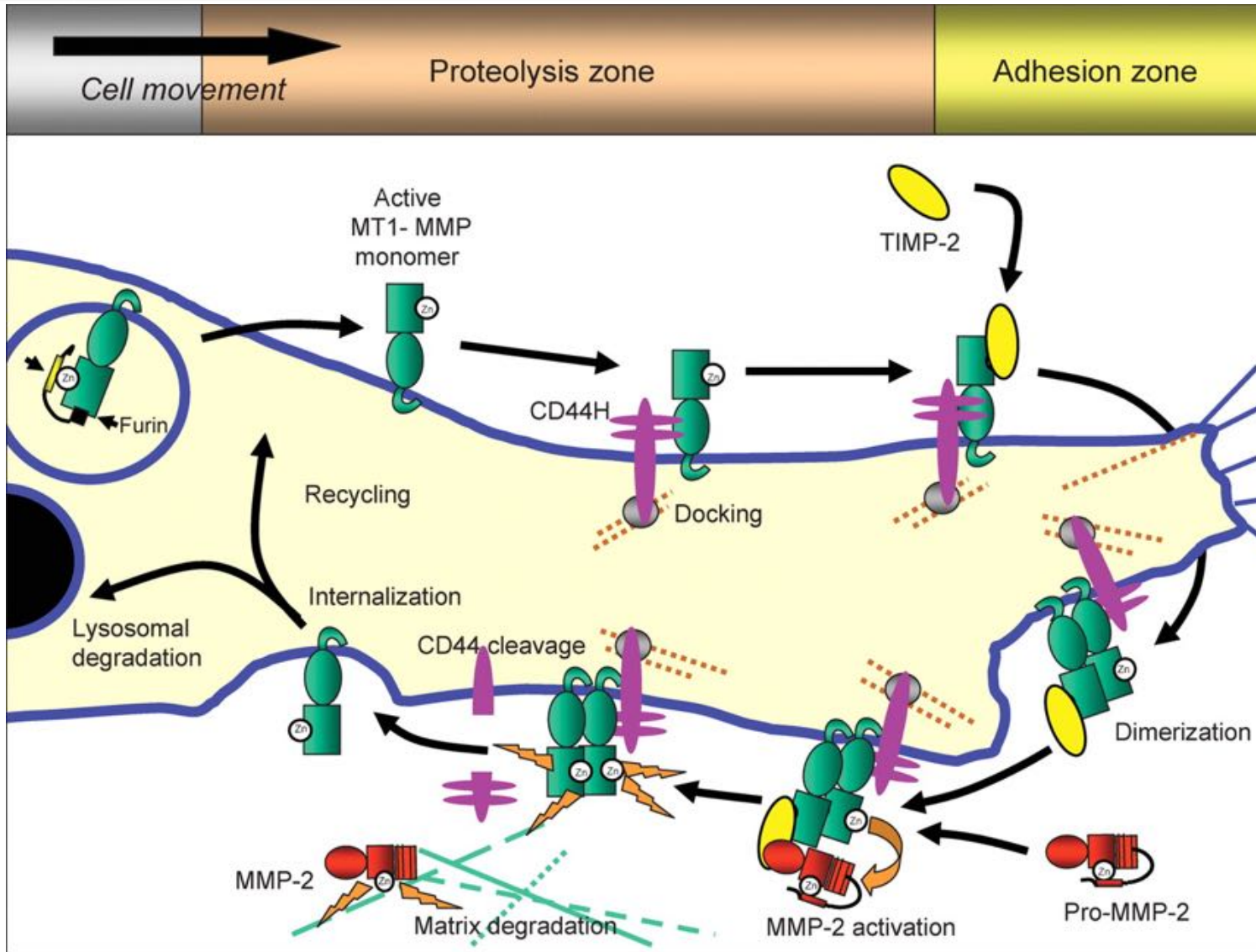
✓ Phalanx Cells - quiescence

Sélection des cellules endothéliales à l'origine du bourgeon

Inhibition adhésion C endo/Cendo et C endo/péricytes

Gradient facteur de croissance

2b- Dégradation matricielle



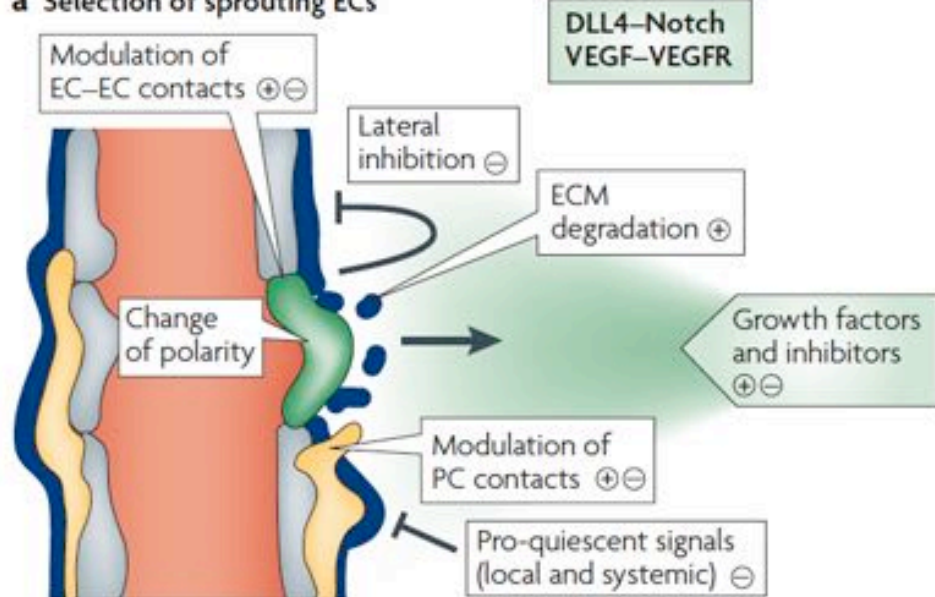
Espace pour la migration des cellules endothéliales

Libération de facteurs de croissance

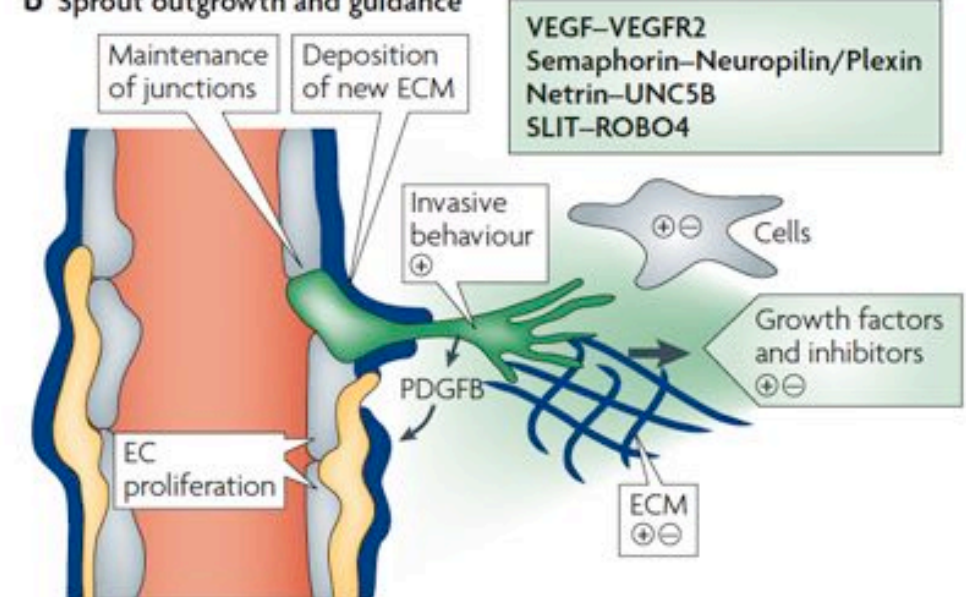
Activation de certaines cytokines (TGF β)

Production de fragments protéolytiques ayant des propriétés angiogéniques

a Selection of sprouting ECs



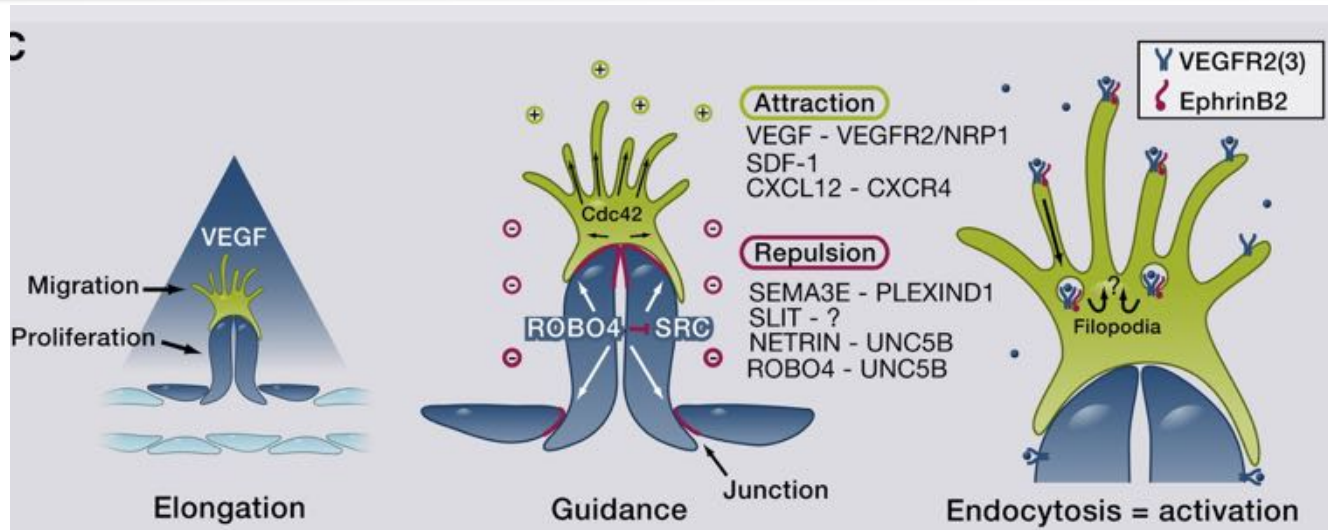
b Sprout outgrowth and guidance



Sélection des cellules endothéliales à l'origine du bourgeon
Inhibition adhésion C endo/Cendo et C endo/péricytes
Gradient facteur de croissance

Développement du bourgeon
Guidance/orientation du néocapillaire

Orientation de la migration des Tip Cells

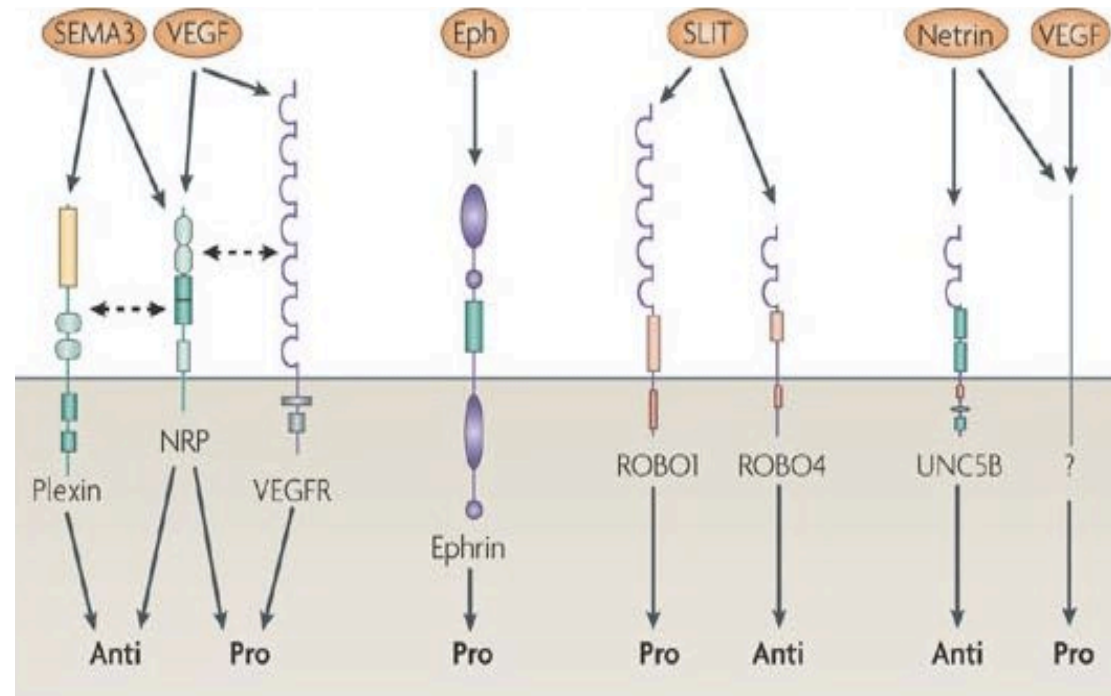


√ Attraction :

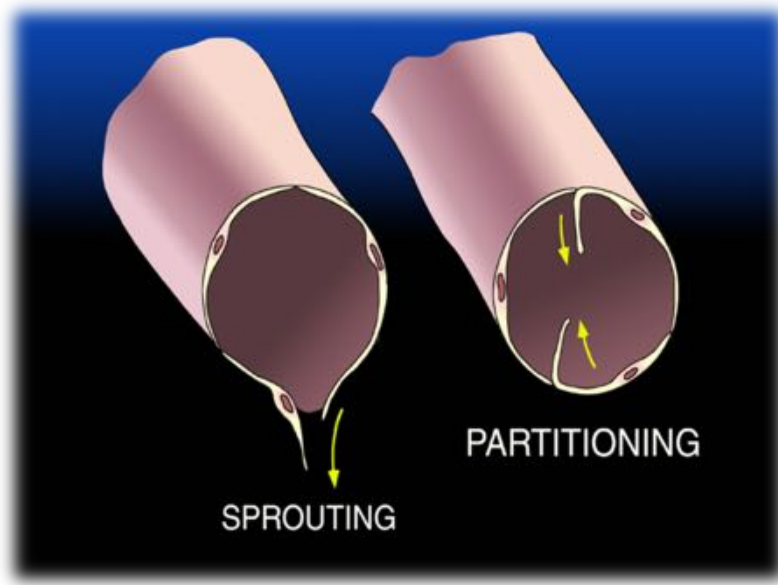
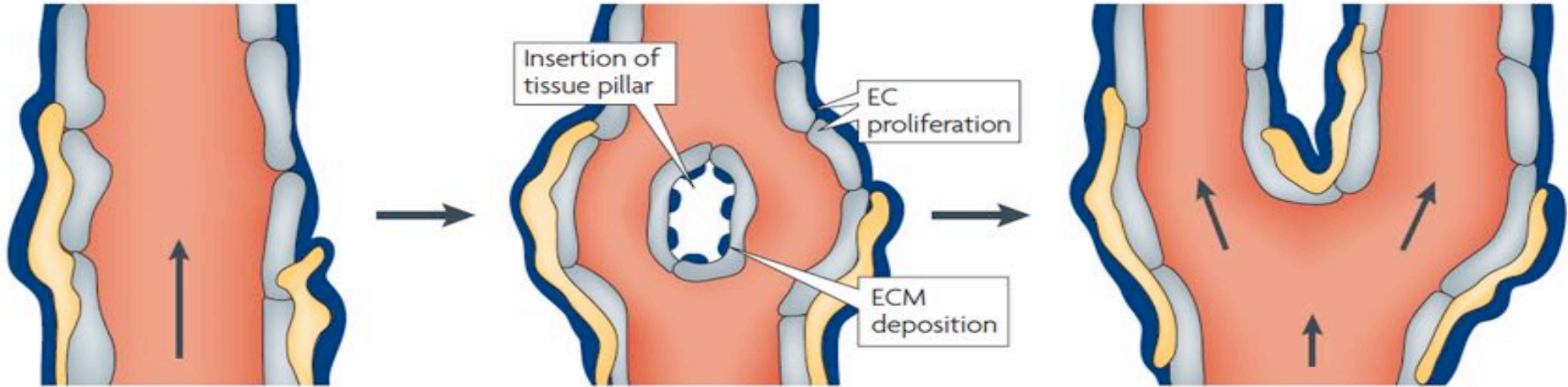
VEGF/VEGFR2
 Slit2/Robo1
 Netrin1/DCC

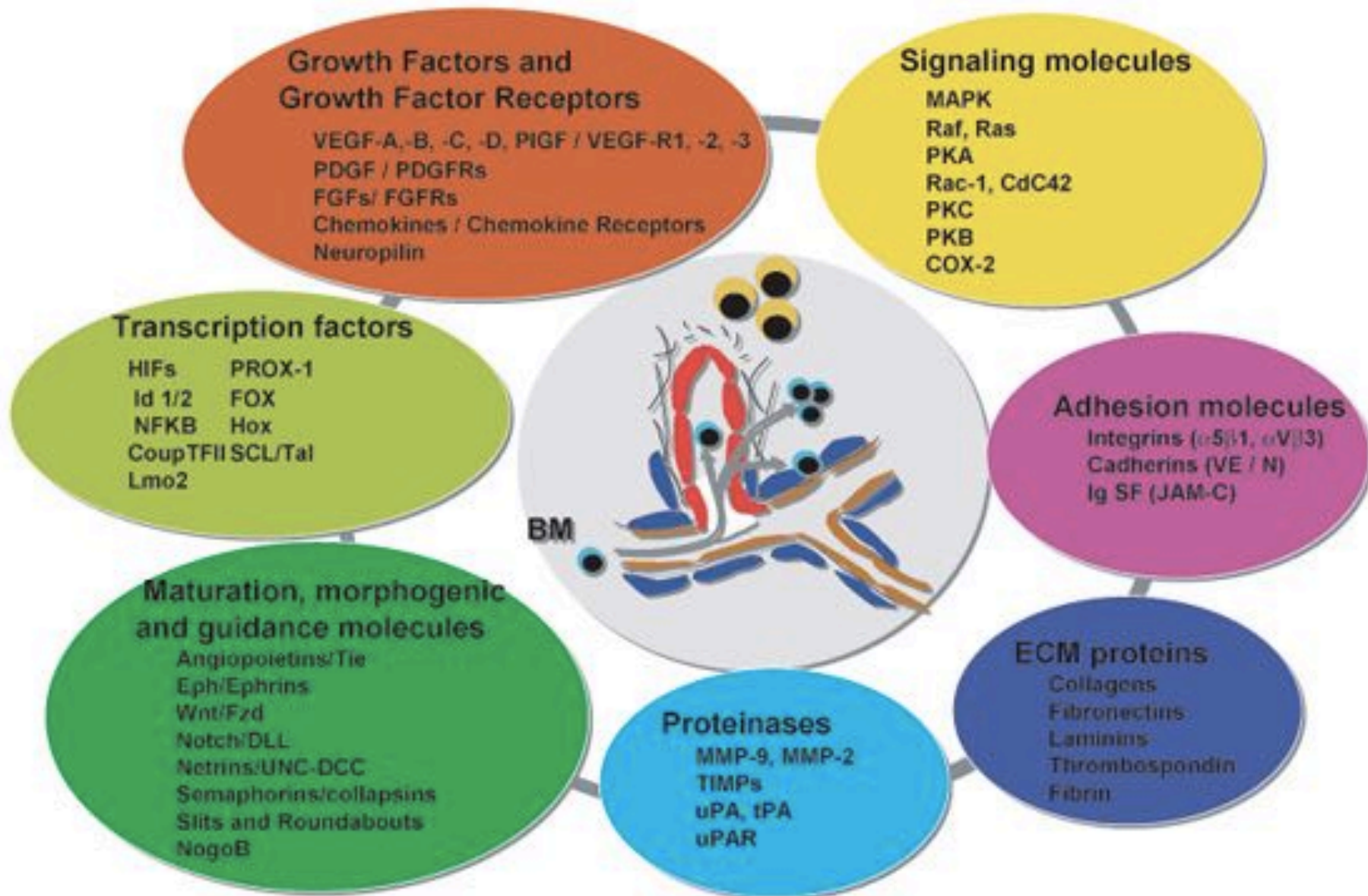
√ Répulsion:

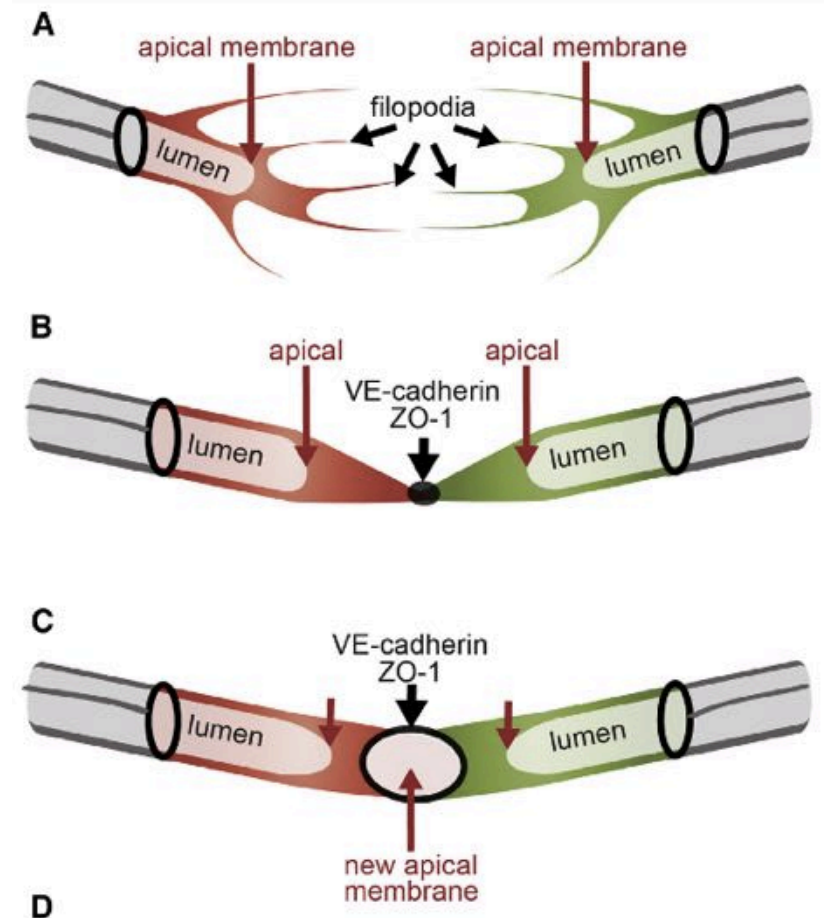
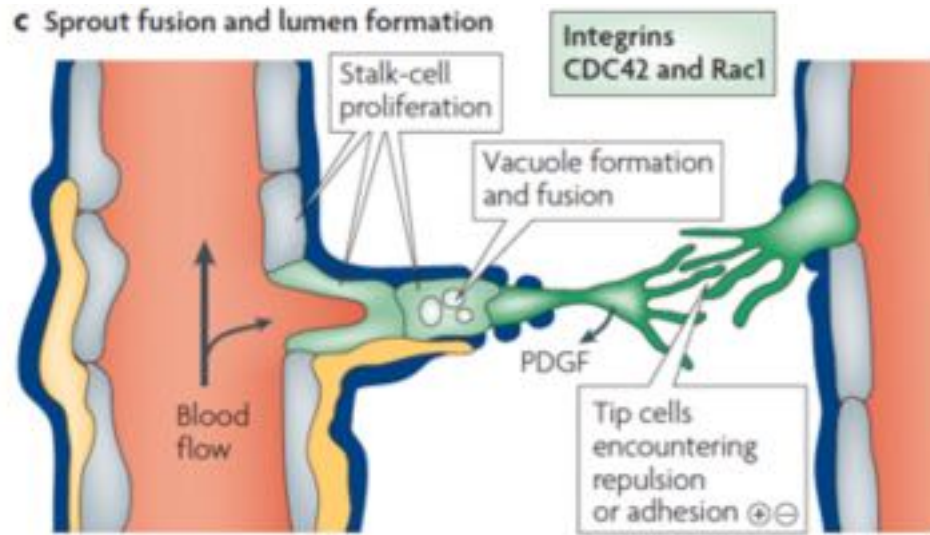
Slit2/Robo4
 Netrin1/UNC5B
 Semaphorin/Plexin D1



Intussusception







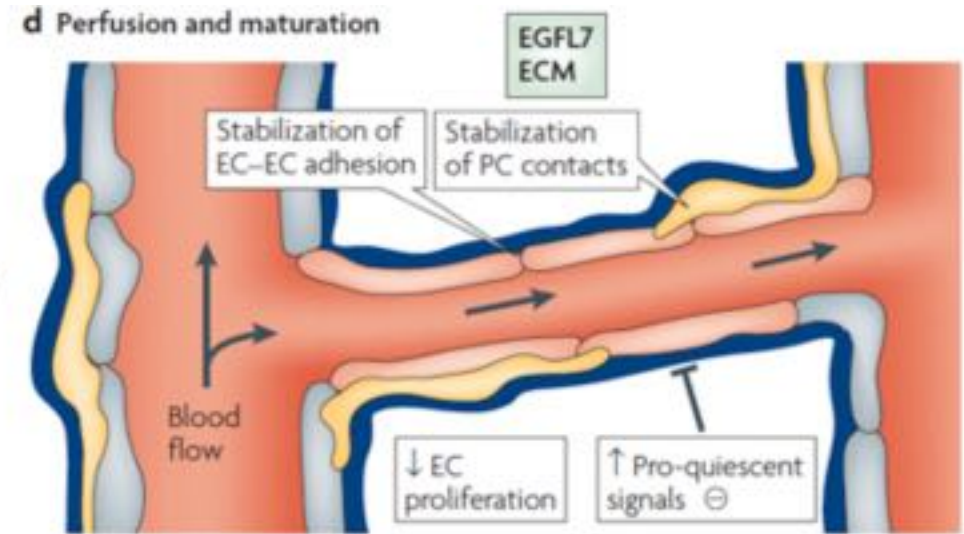
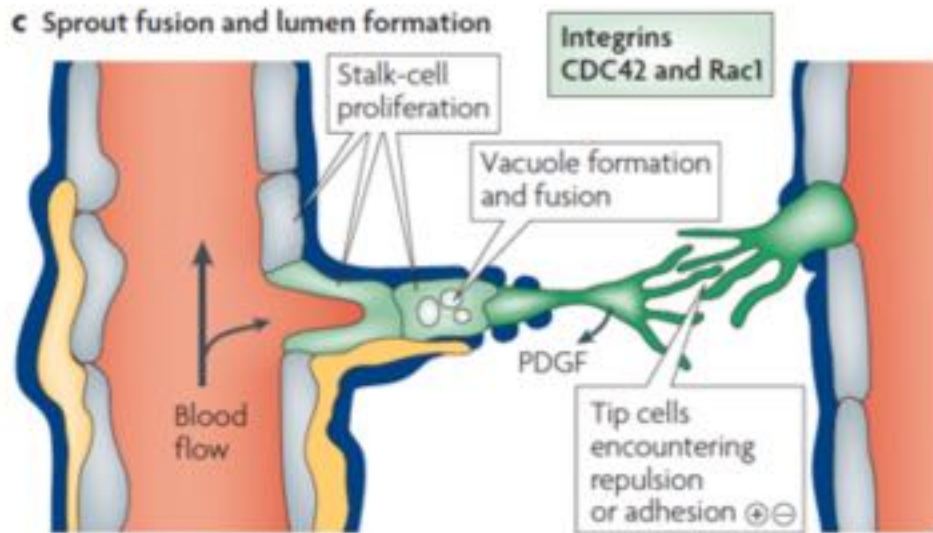
(A) Contact entre les tip cells par les filopodes.

(B) Formation de connections stables (expression et co-localisation de VE-cadherin et ZO-1).

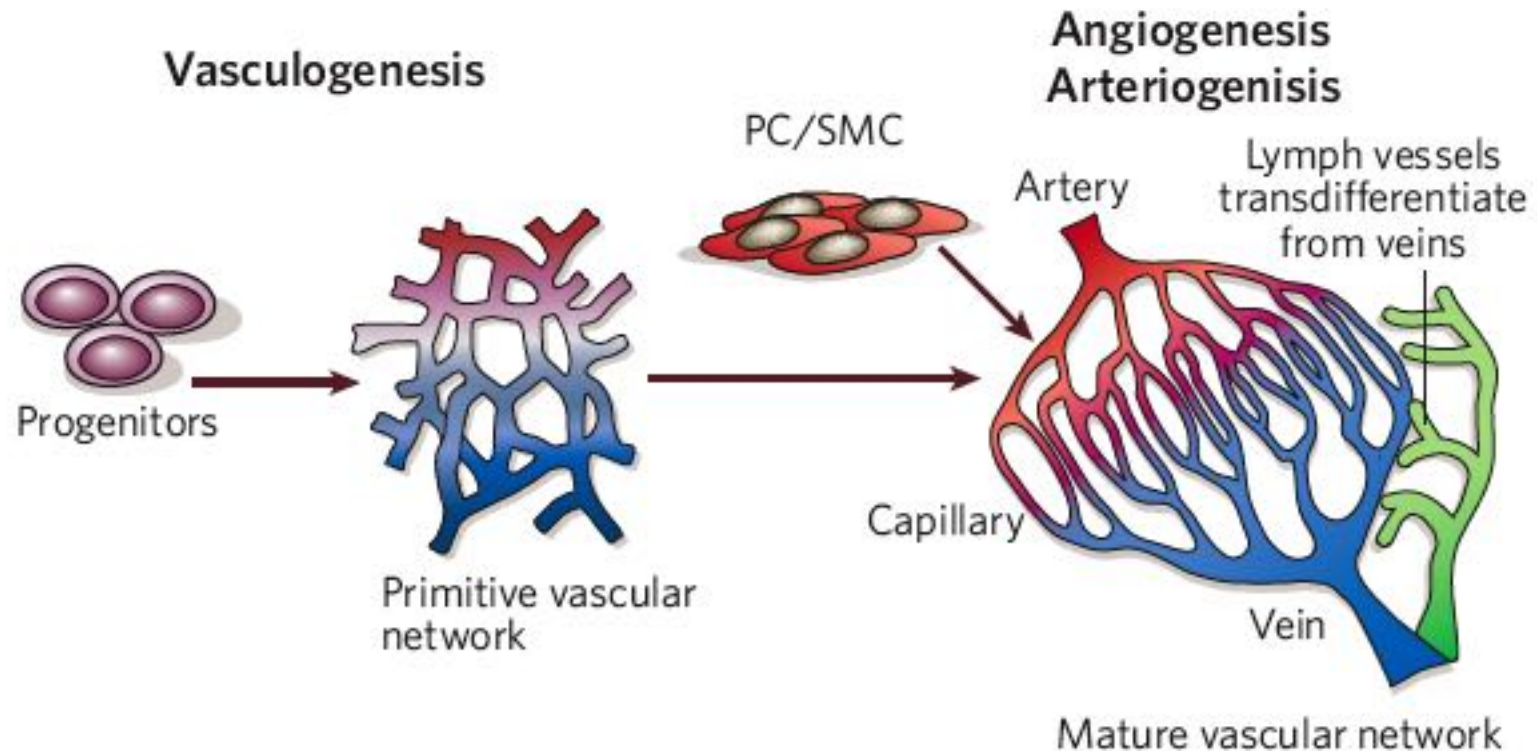
(C) Aux sites de contact, une nouvelle membrane apicale est insérée (localisation de Podocalyxin-like 2).

Fusion des bourgeons
Formation de la lumière vasculaire

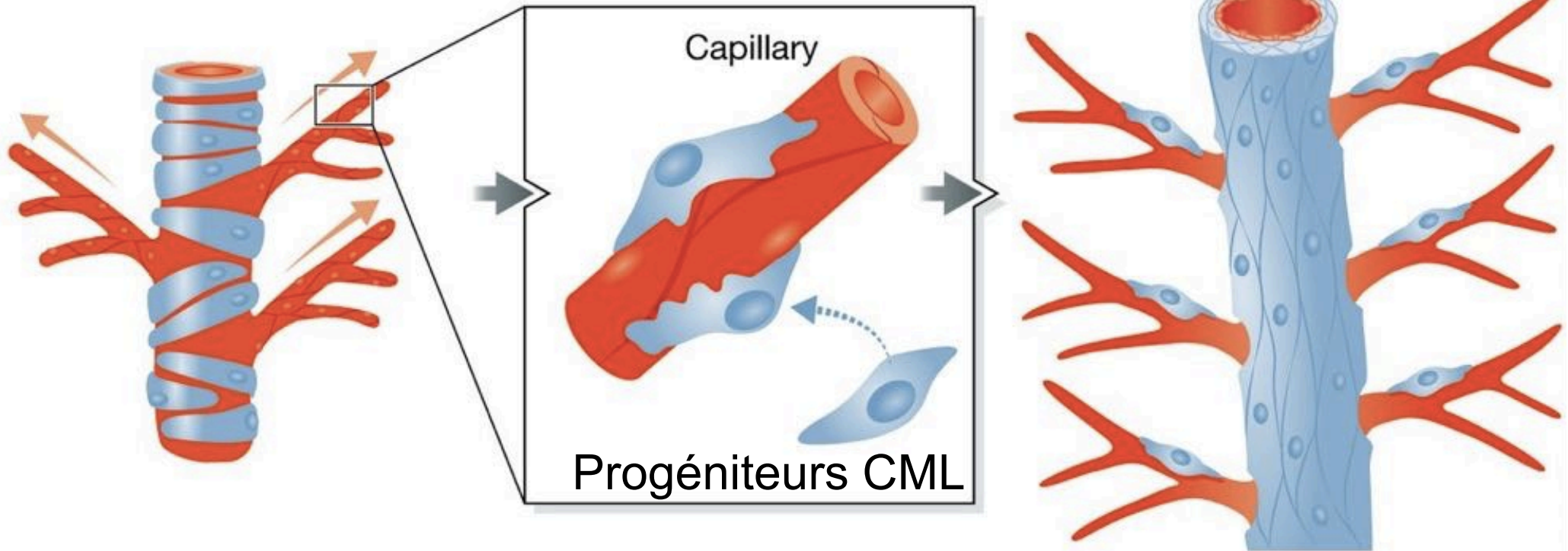
Stabilisation des adhésions entre cellules endothéliales
Stabilisation de la structure capillaire par les péricytes



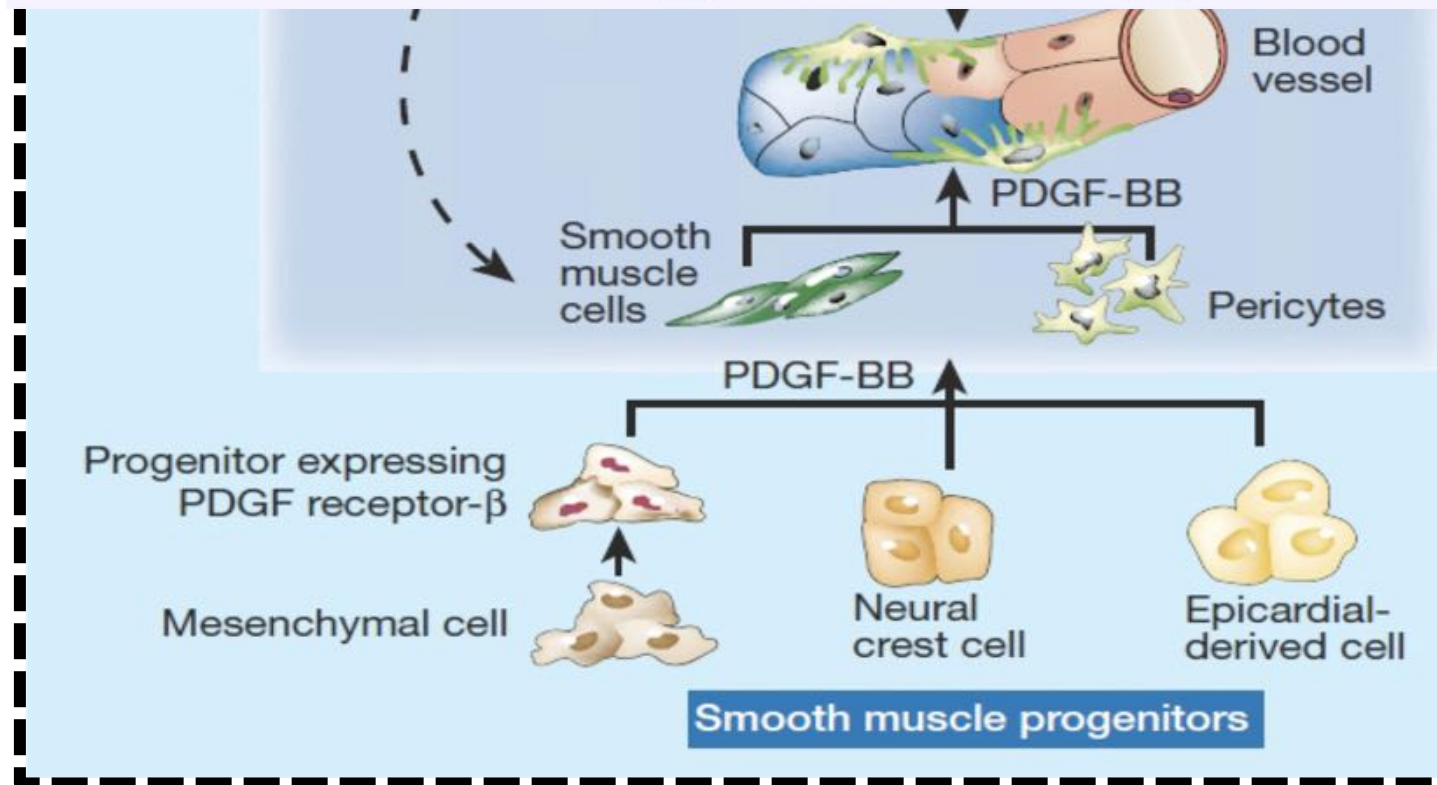
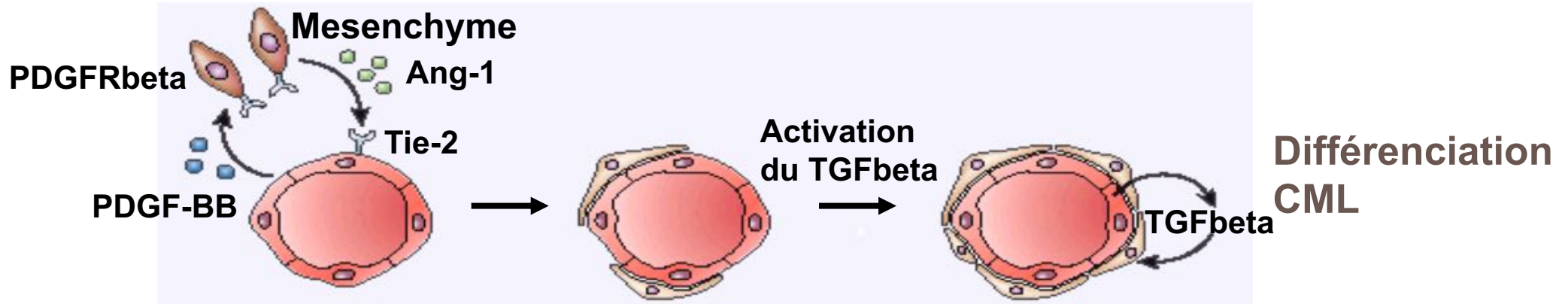
-IV- ARTERIOGENESE



- Recrutement des cellules souches pariétales
- Différenciation/prolifération en CML
- Epaissement pariétale: production MEC
- Acquisition des propriétés contractiles

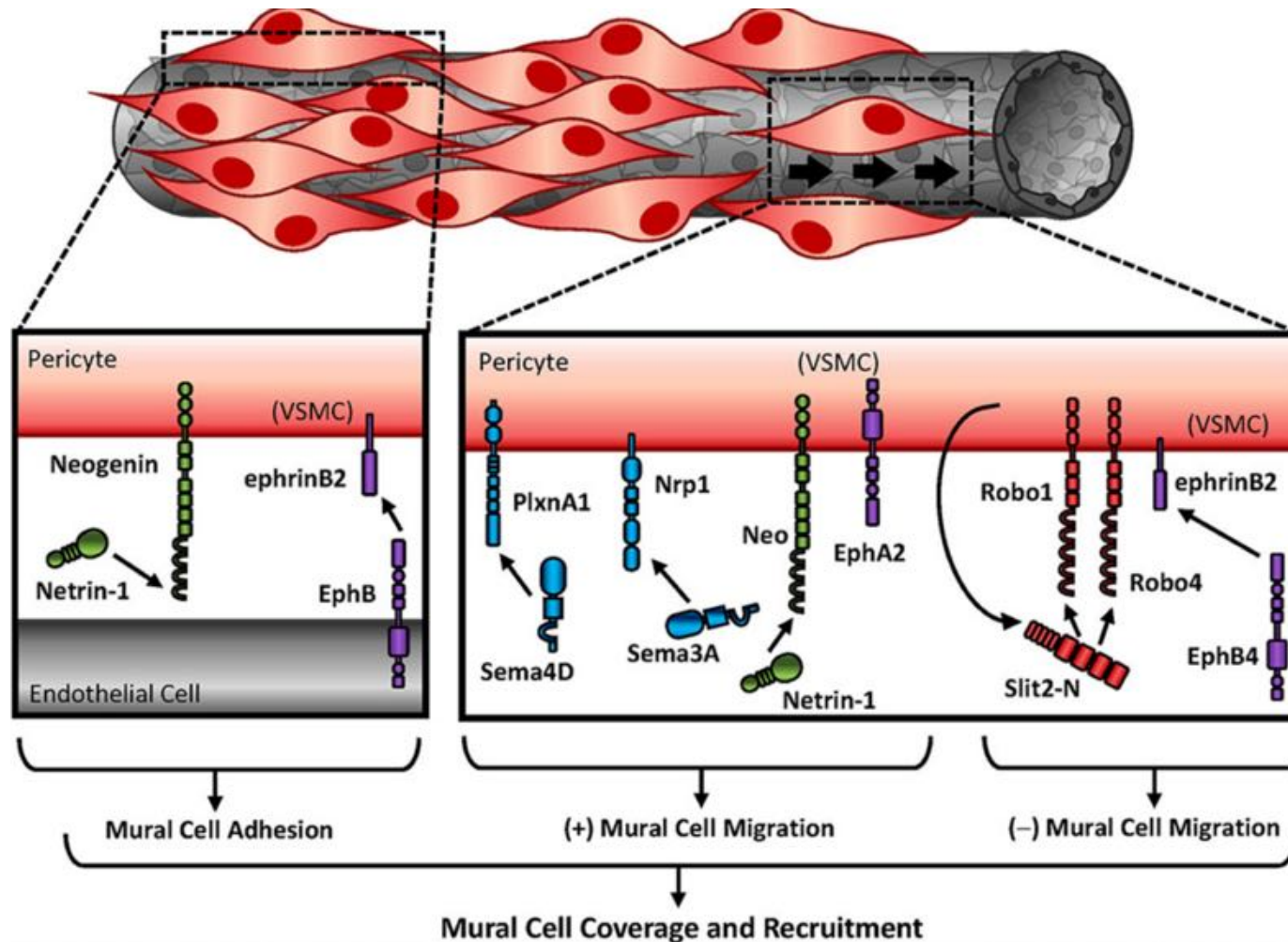


1- Assemblage des cellules musculaires lisses



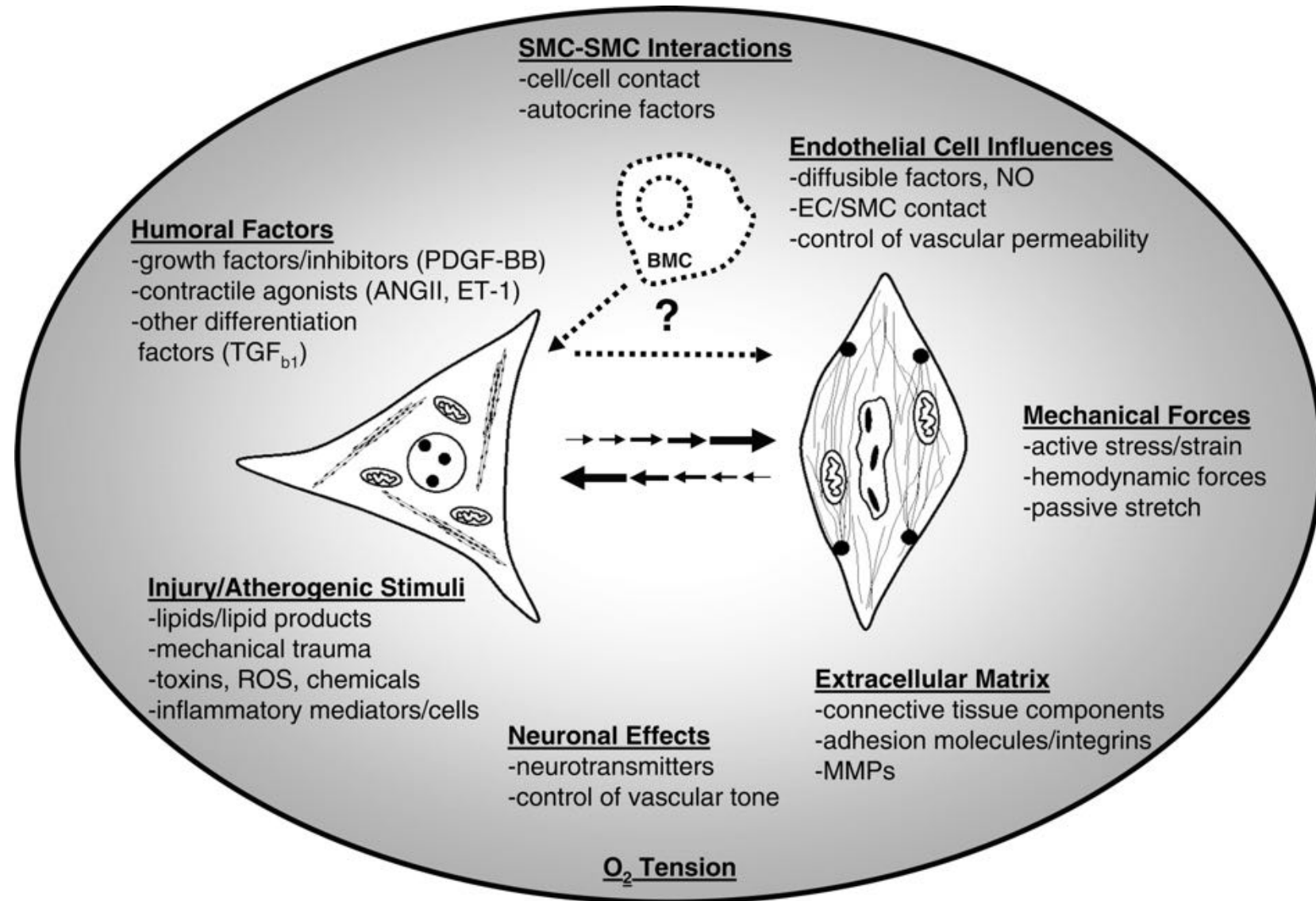
Origine des CML

1- Assemblage des cellules musculaires lisses

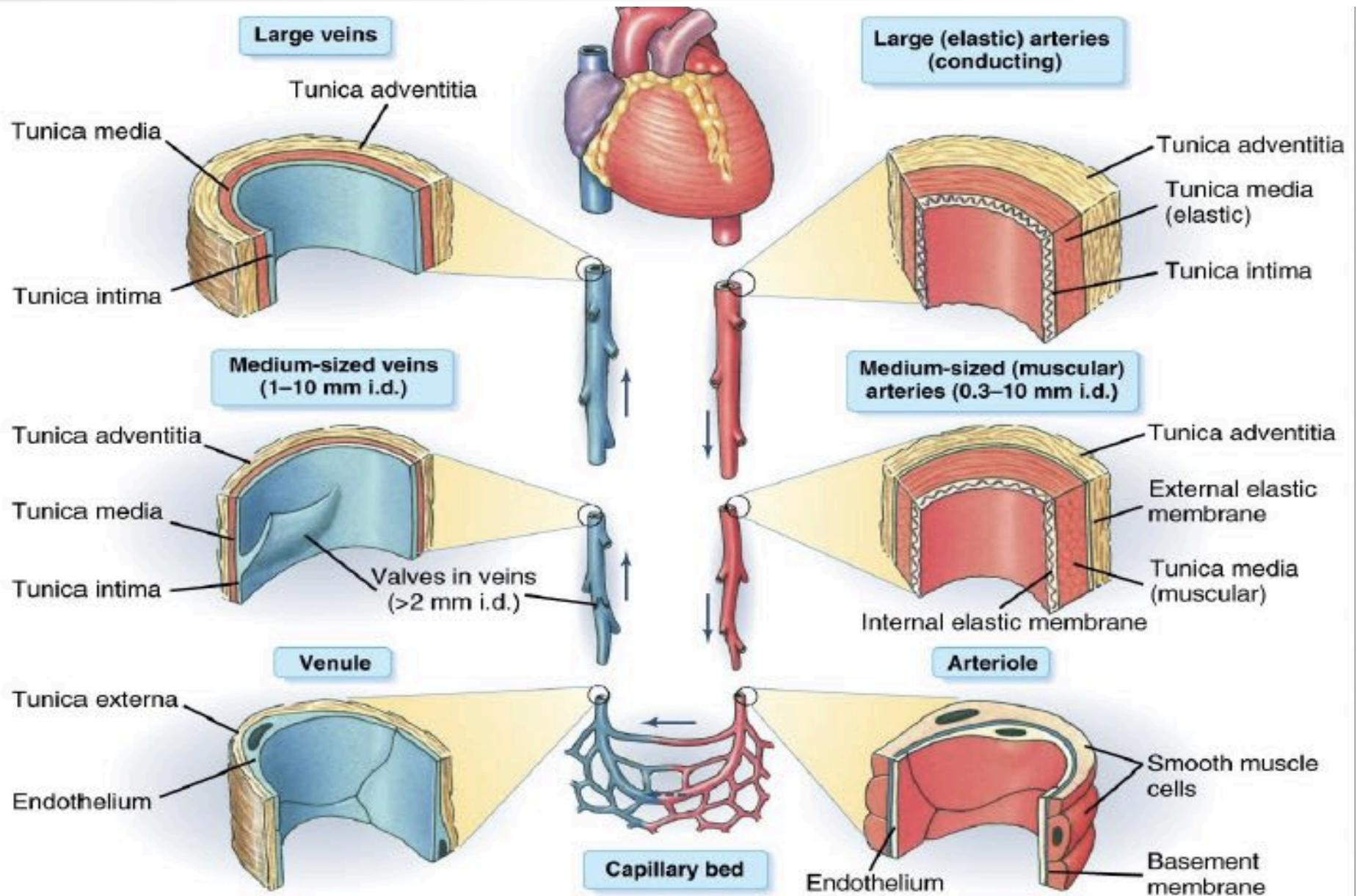


L'expression différentielle des molécules de guidage régule l'assemblage des CML. Alors que les sémaphorines et les nétrines favorisent la migration des cellules murales, les Slits et les éphrines inhibent la migration des cellules murales.

L'état de différenciation des cellules musculaires lisses est très plastique et dépend de l'intégration de multiples signaux provenant du microenvironnement.



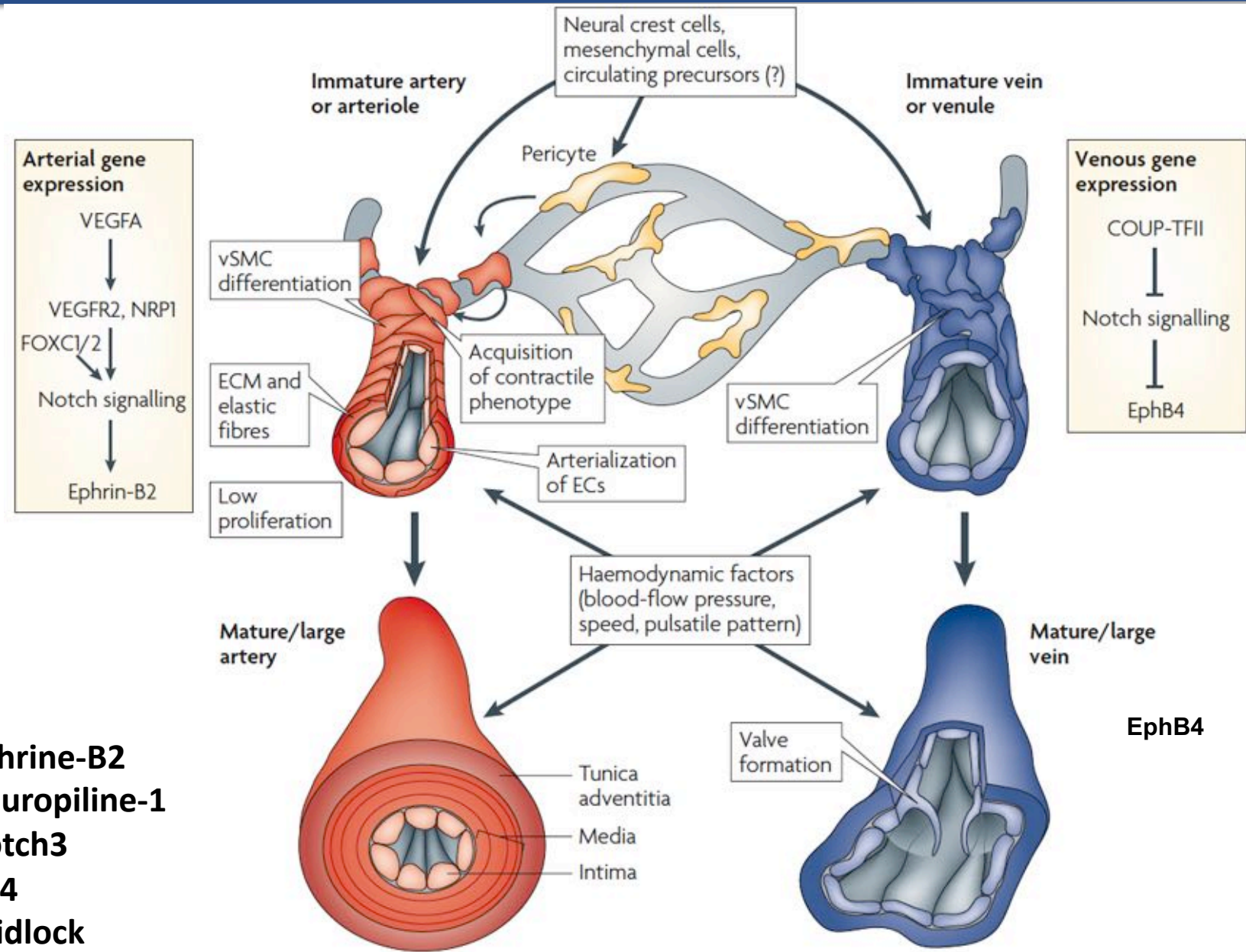
3- Développement de la MEC et acquisition des propriétés contractiles



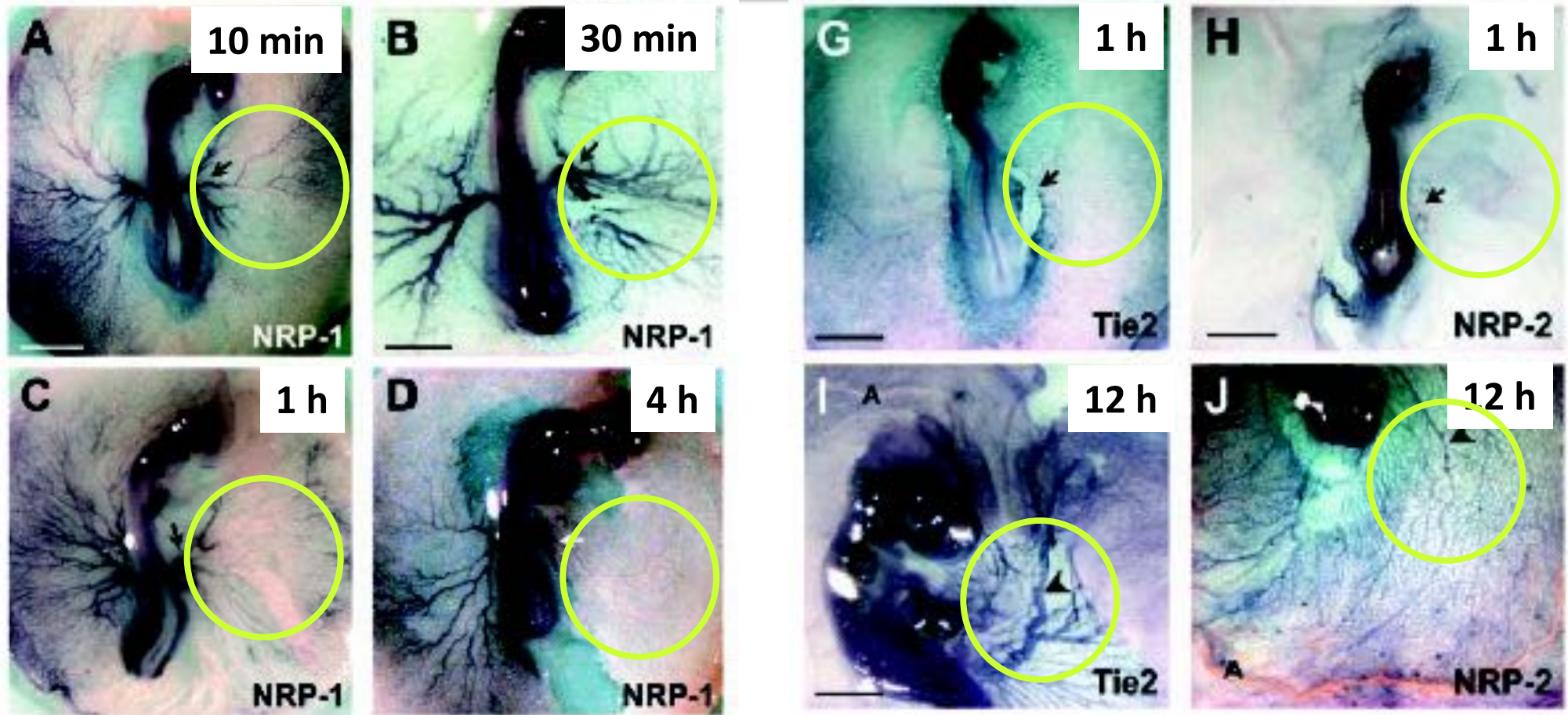
-V-

Maturation de l'arbre vasculaire

1- Différenciation artérioveineuse



1- Différenciation artériovoineuse: facteurs hémodynamiques

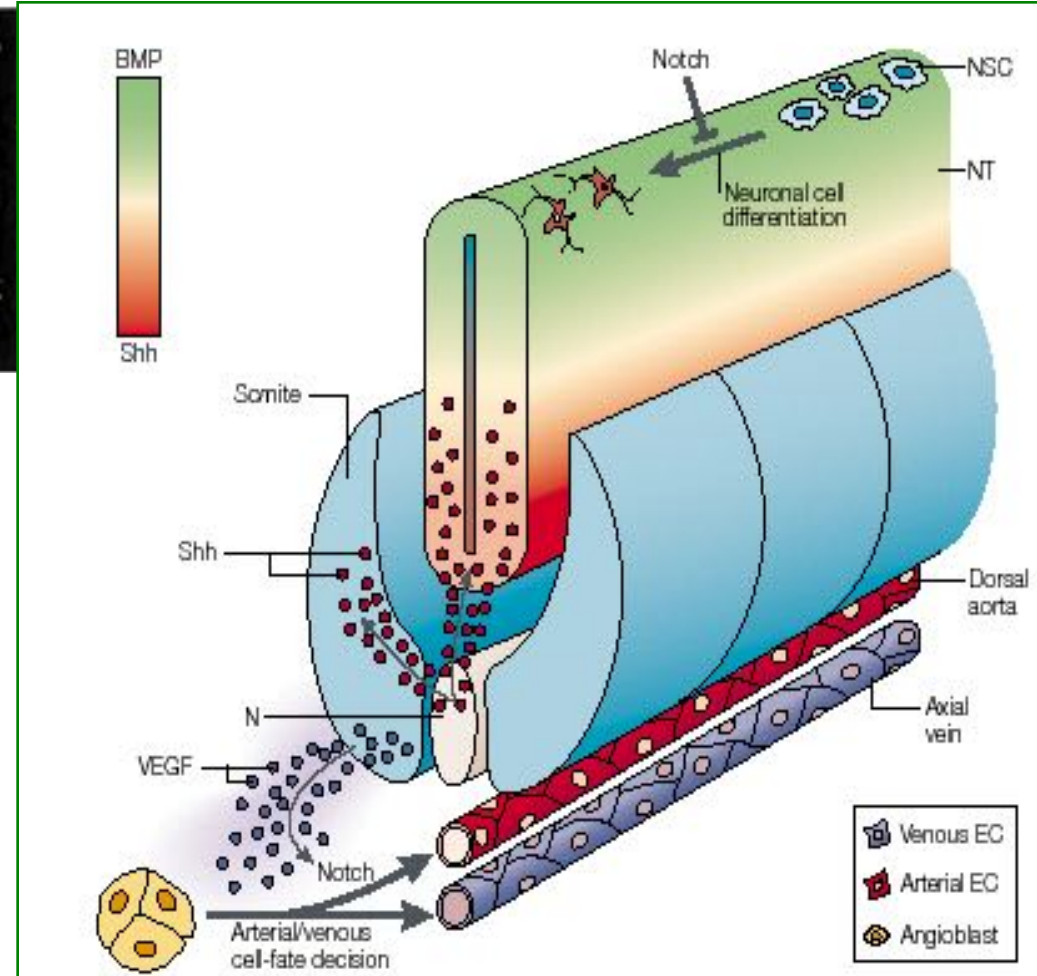
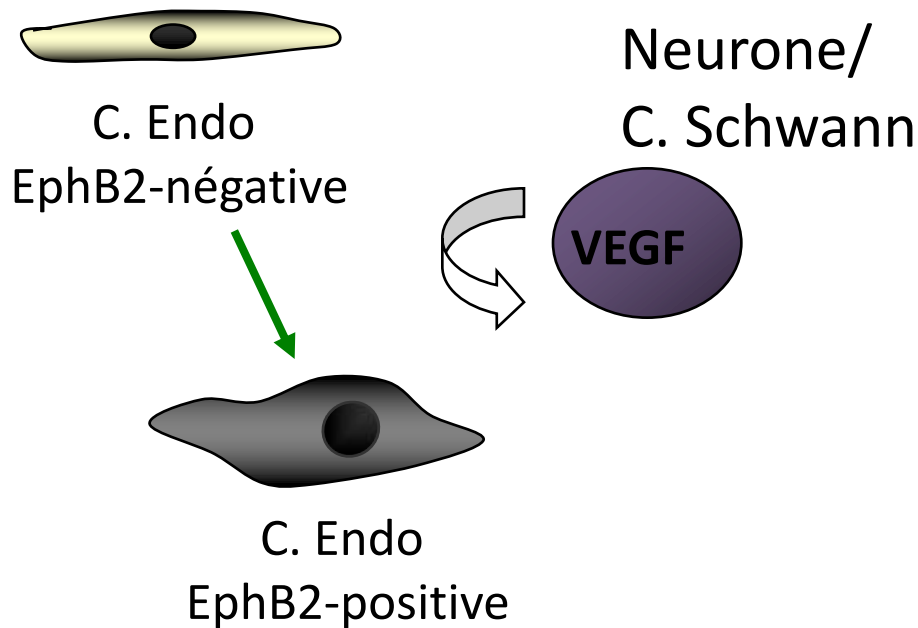
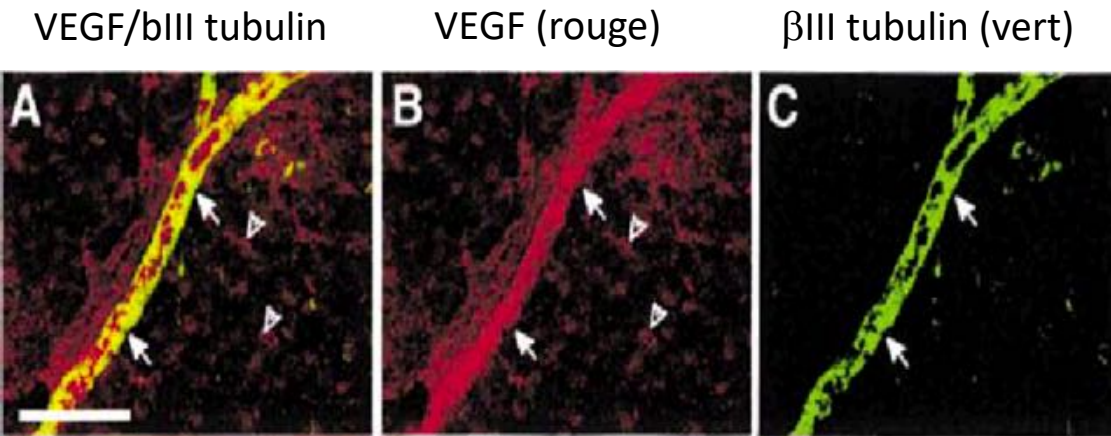


- expression marqueurs artériels

+ expression marqueurs veineux

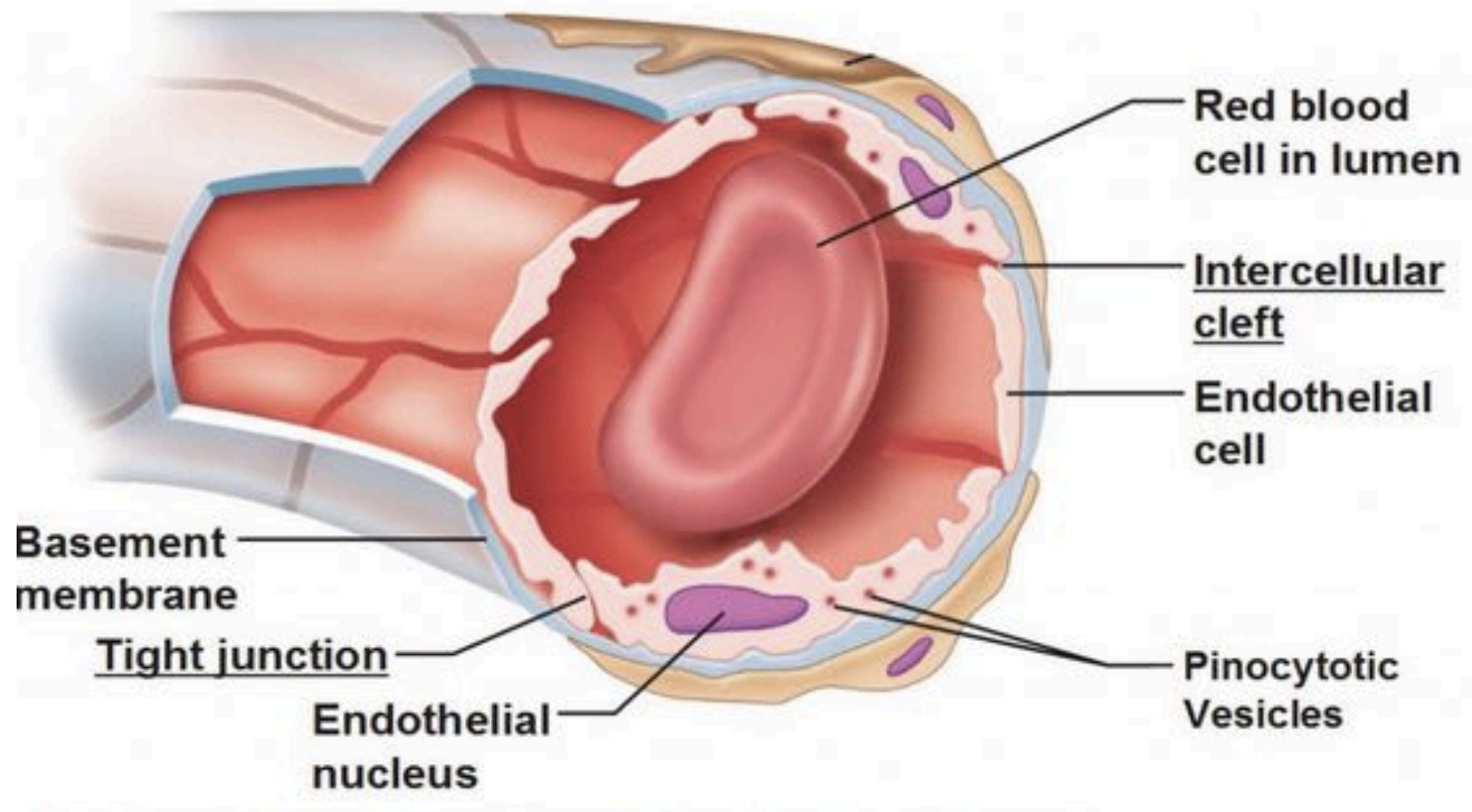
Ligature artère vitelline droite
Embryons de poulet, tps post-ischémique

1- Différenciation artério-veineuse: système nerveux



2- Spécialisation tissu spécifique: différents types de capillaires

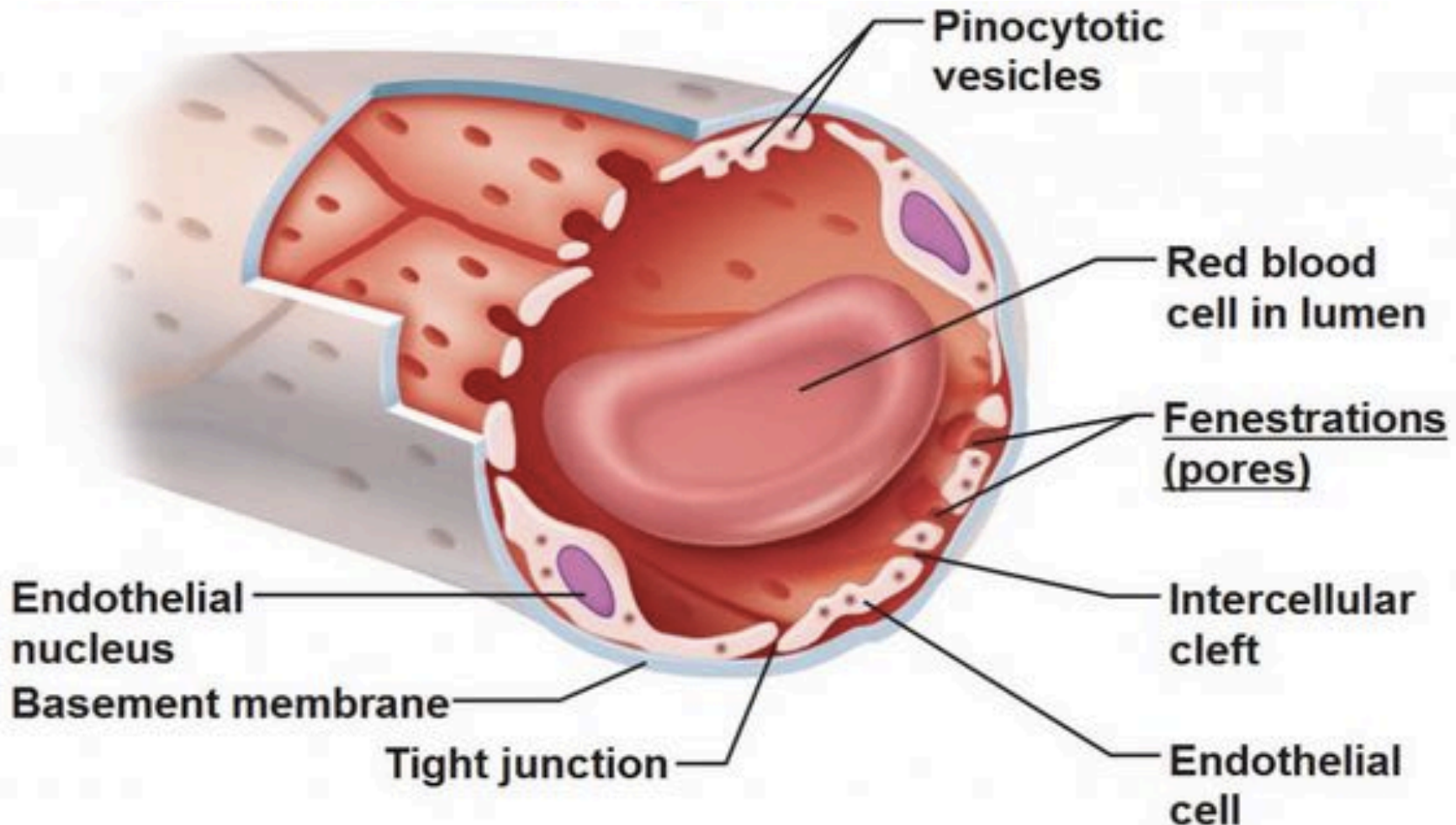
Capillaires continus: Nombreuses jonctions serrées – Echanges de solutés.



Peau, Muscles

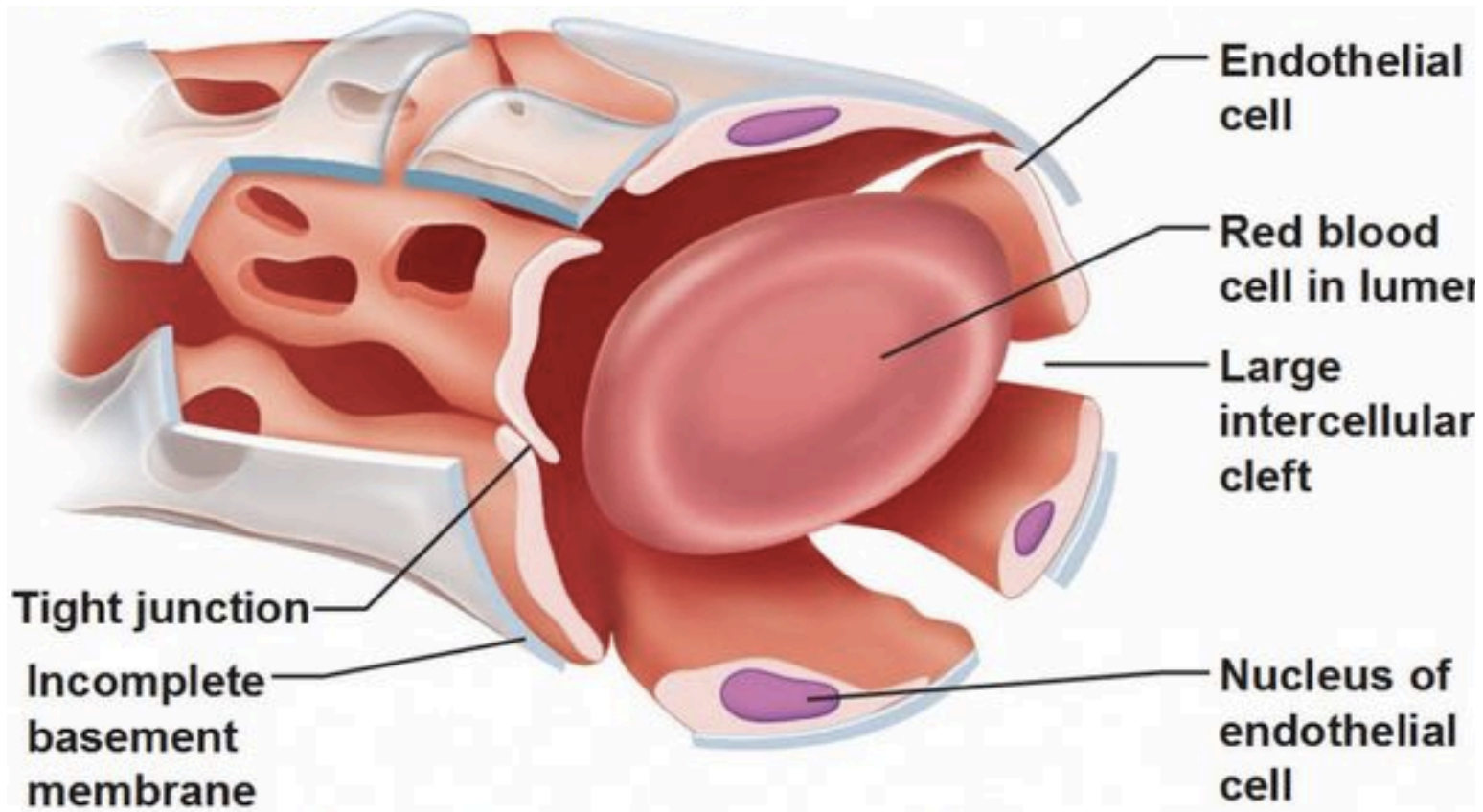
2- Spécialisation tissu spécifique: différents types de capillaires

Capillaires fenestrés: Pores à travers cellules endothéliales et membranes basales –
Echanges de molécules.



2- Spécialisation tissu spécifique: différents types de capillaires

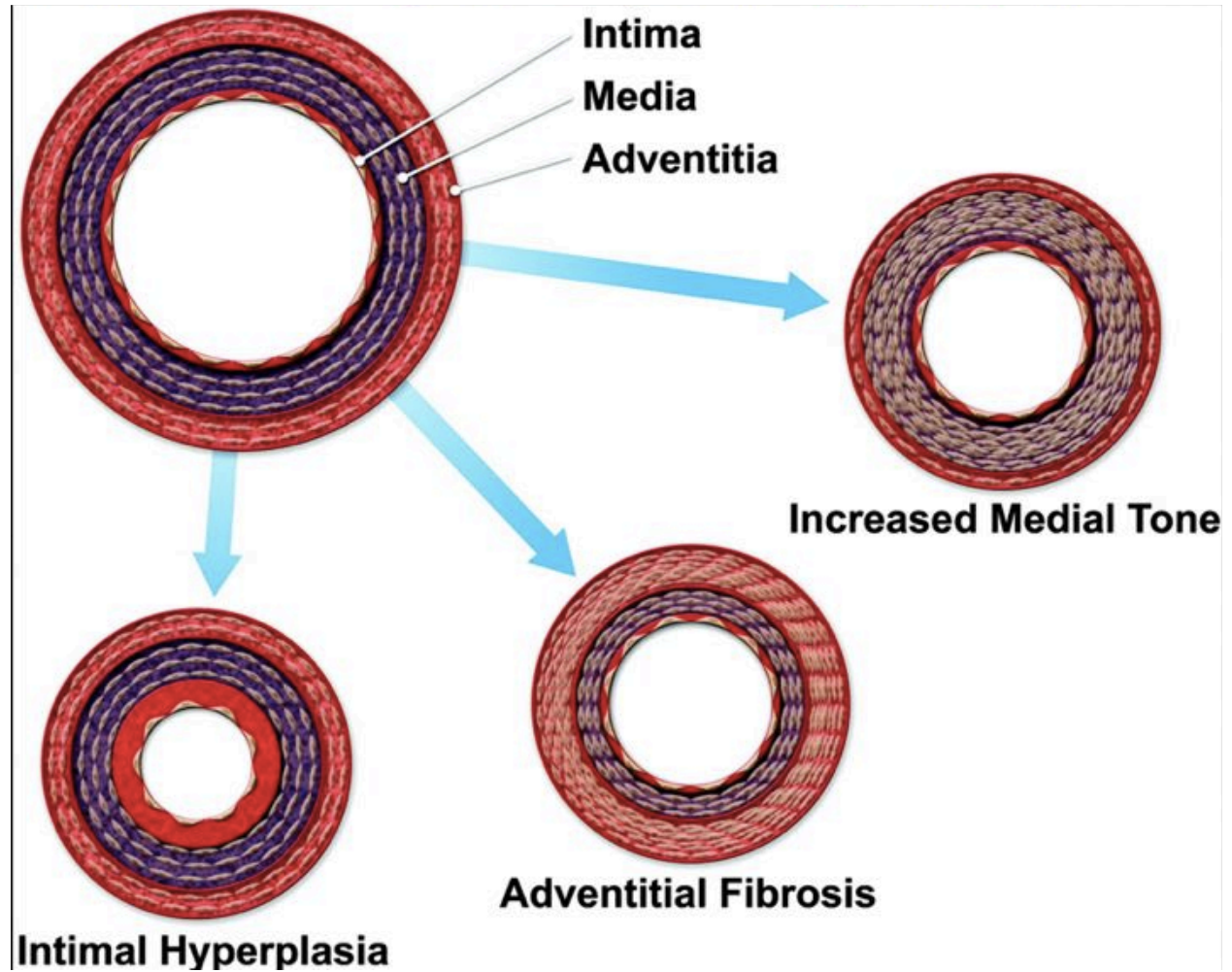
Capillaires sinusoidaux: Peu de jonctions serrées, grands espaces intercellulaires, membranes basales incomplètes – Echanges de macromolécules et cellules.



Modification de la structure du vaisseau (diamètre du vaisseau et épaisseur de la paroi artérielle) en réponse à un stimulus

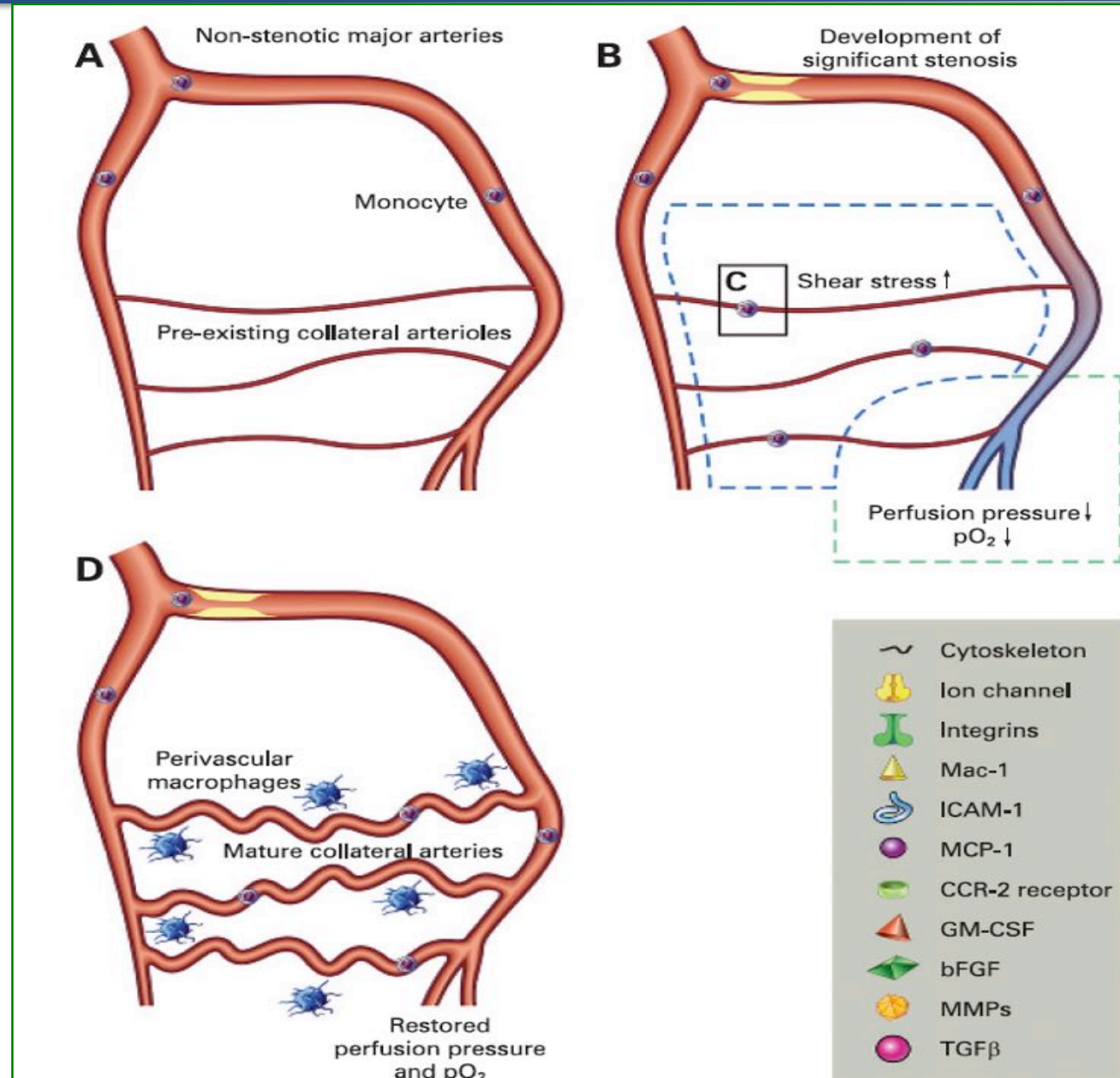
Processus physiologique et/ou pathologique

Artères de résistance et de conductance

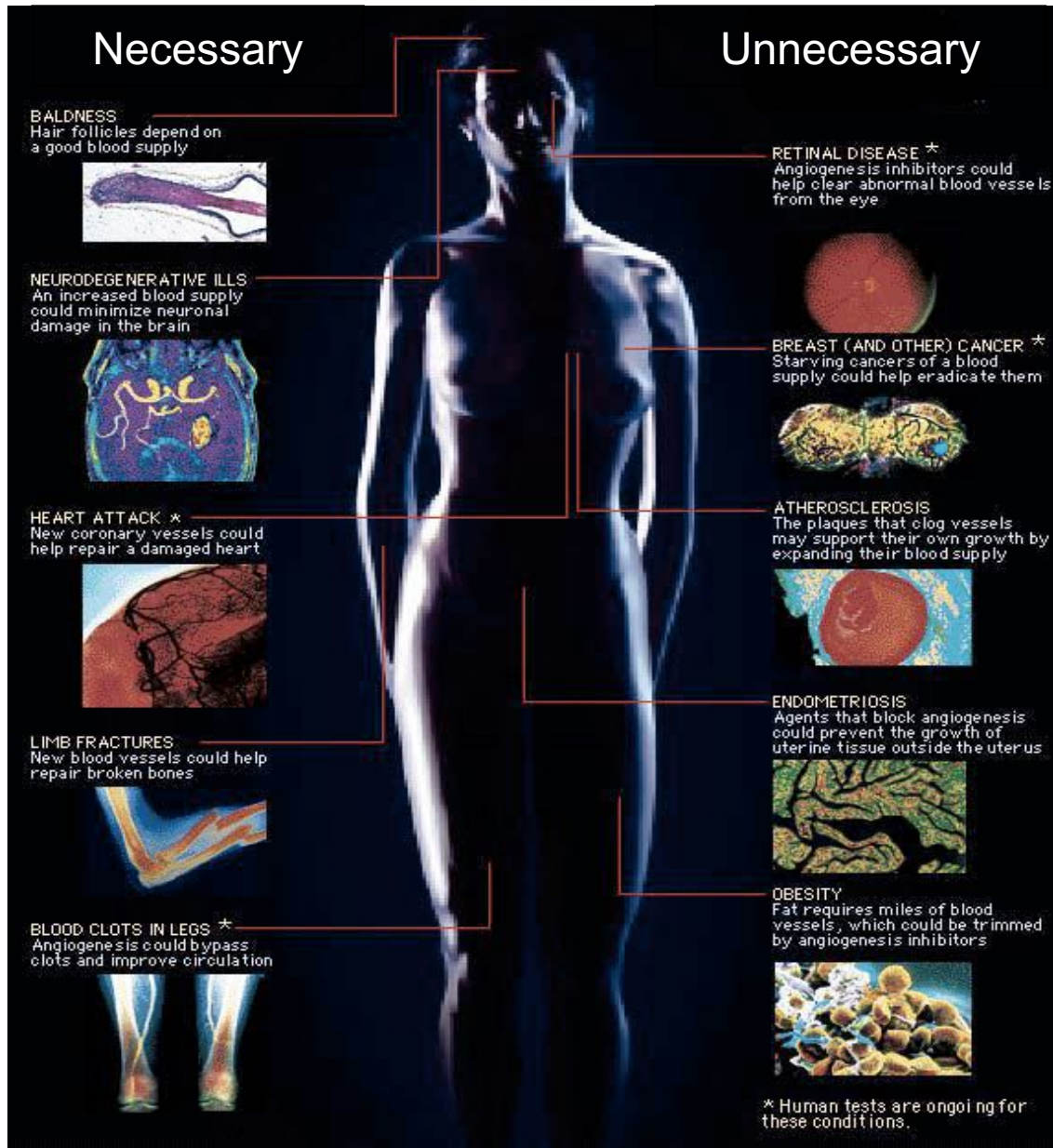


Modification de la structure du vaisseau (diamètre du vaisseau et épaisseur de la paroi artérielle) en réponse à une augmentation du débit sanguin dans l'artère collatérale

✓ Cellules musculaires lisses: prolifération



-VI-
ANGIOGENESE THERAPEUTIQUE



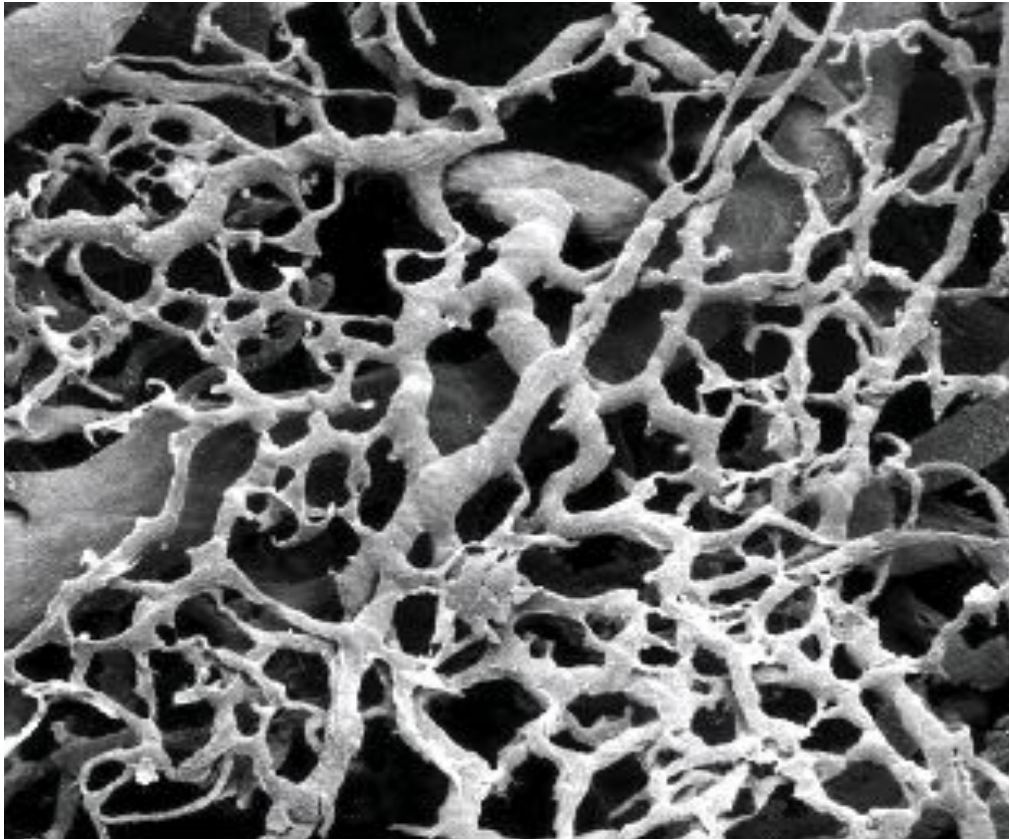
Inhibition de l'angiogenèse

Hémangiomes
Psoriasis
Sarcome de Kaposi
Rétinopathie
Arthrite rhumatoïde
Athérosclérose
Croissance tumorale et
Métastase

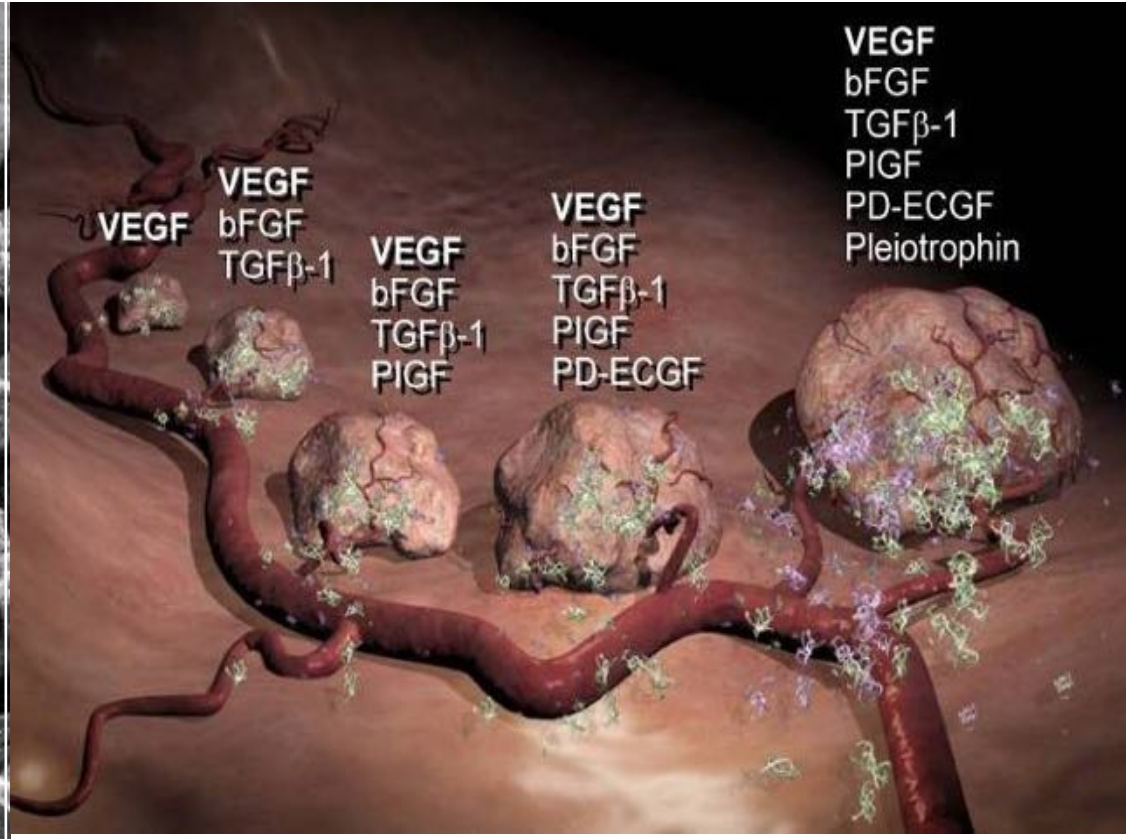
Activation de l'angiogenèse

Pathologie ischémique
 Ischémie myocardique
 Ischémie périphérique
 Ischémie cérébrale
Cicatrisation
Chirurgie reconstructive

Vascularisation desorganisée (pas de hiérarchie, artères/capillaires)
Microscopie électronique

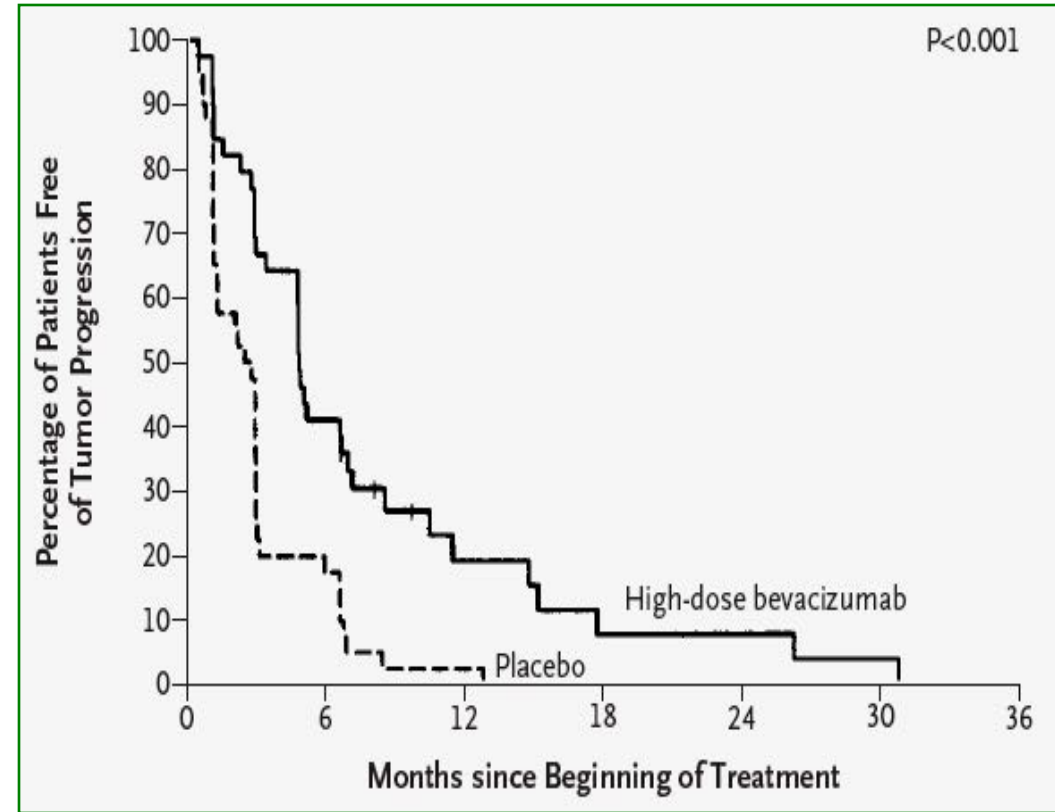
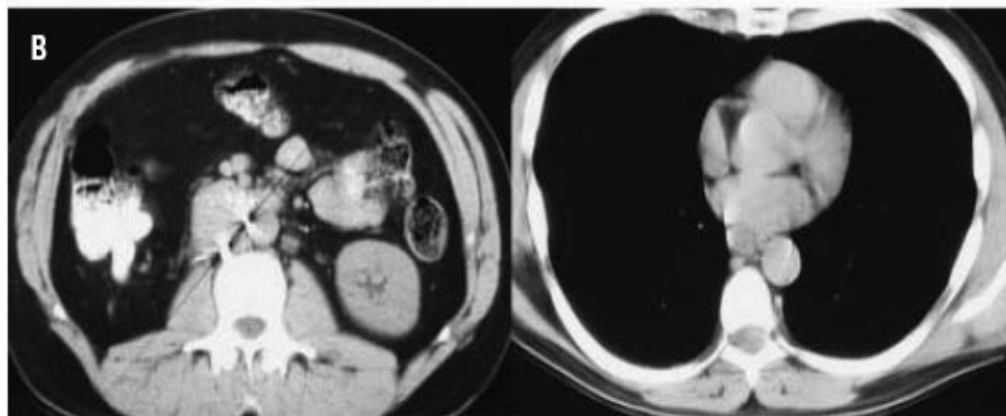
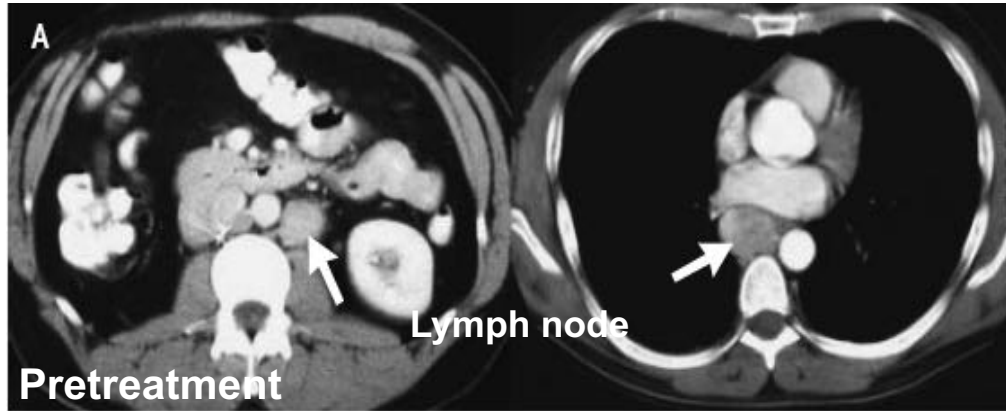


Toutes les étapes du développement tumoral dépendent des facteurs de croissance vasculaire



Un exemple: Benvacizumab (avastin): Ac anti-VEGF

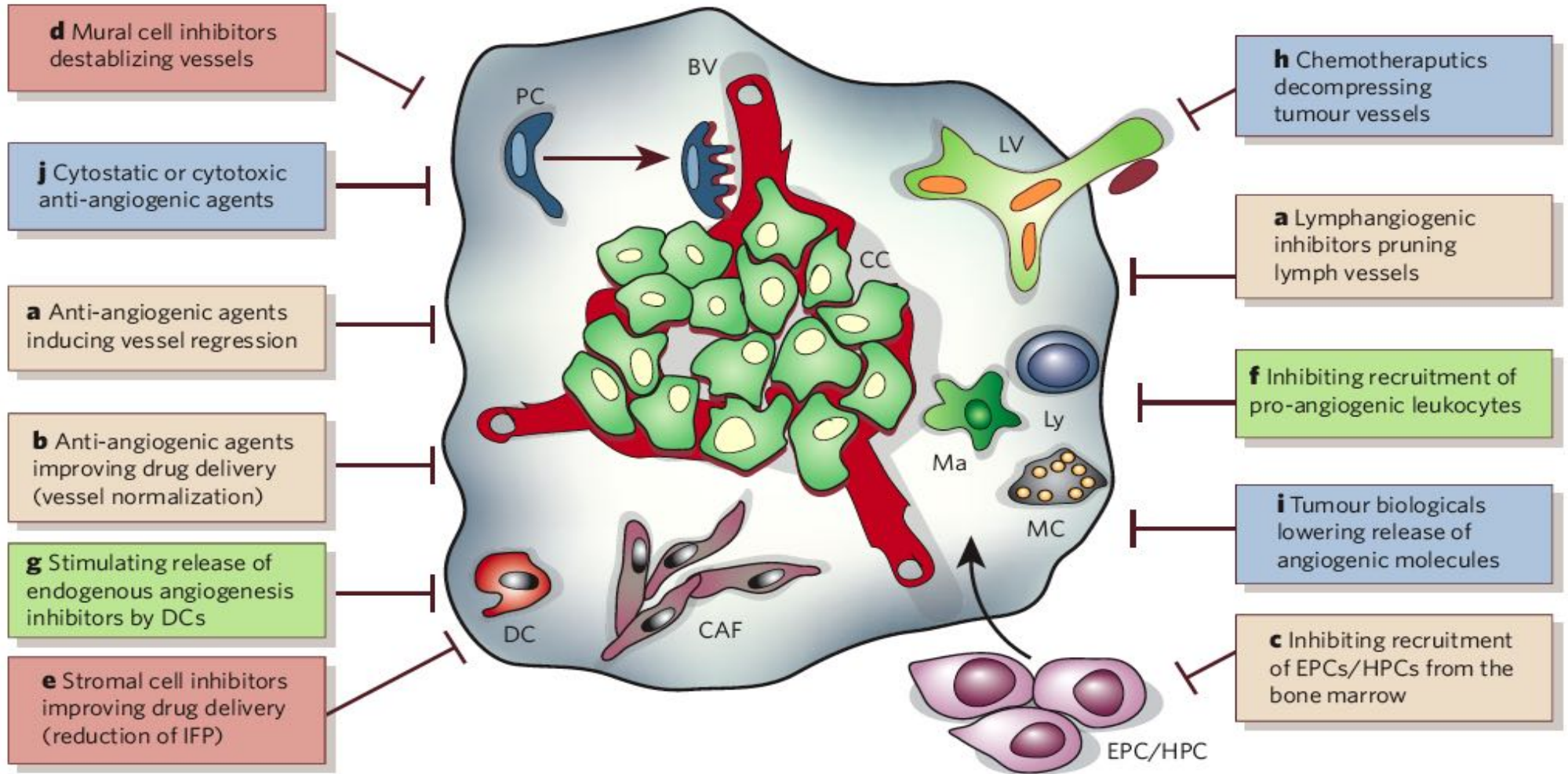
116 patients, Phase 2, carcinome rein, métastasique



Yang et al, NEJM, 2003

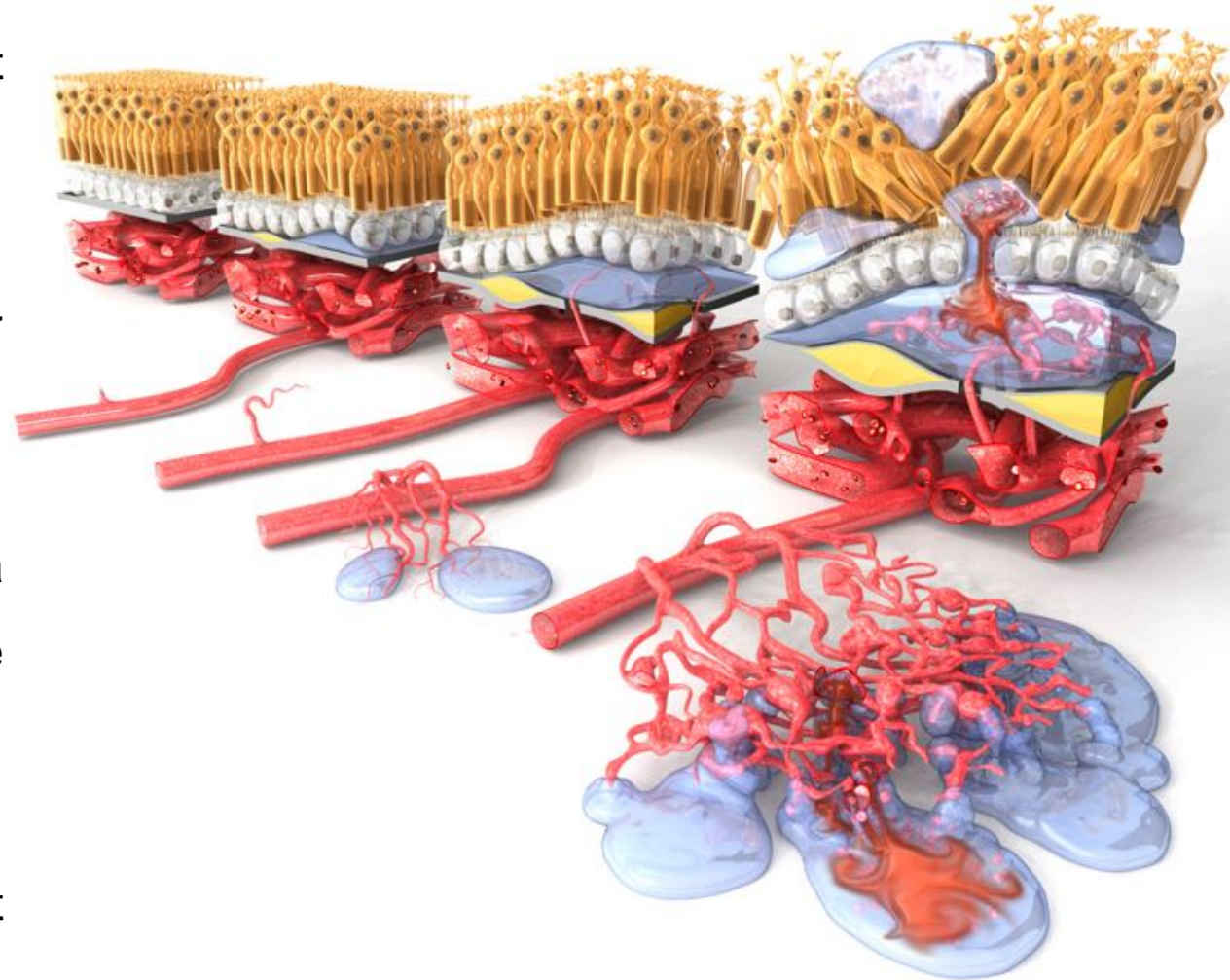
Ellis et al, Nat Rev Drug Discov, 2005 = Approval by the US FDA for metastatic colorectal cancer (+chemotherapy)

1- Inhibition de l'angiogenèse: pathologies tumorales



2- Inhibition de l'angiogenèse: pathologies rétiniennes

- Stress oxydatif (âge, tabac, diabète) et développement d'une hypoxie et d'une inflammation
- Sécrétion de facteurs pro-angiogéniques
- Stimulation de l'angiogenèse dans la couche choroïde, accumulation de fluide dans la couche rétinienne.
- Les nouveaux vaisseaux sont desorganisés et perméables



Intravitreal (“inside the eye”) drug injections:

- Implants corticostéroïdes

- **4 majors anti-VEGF therapies:**

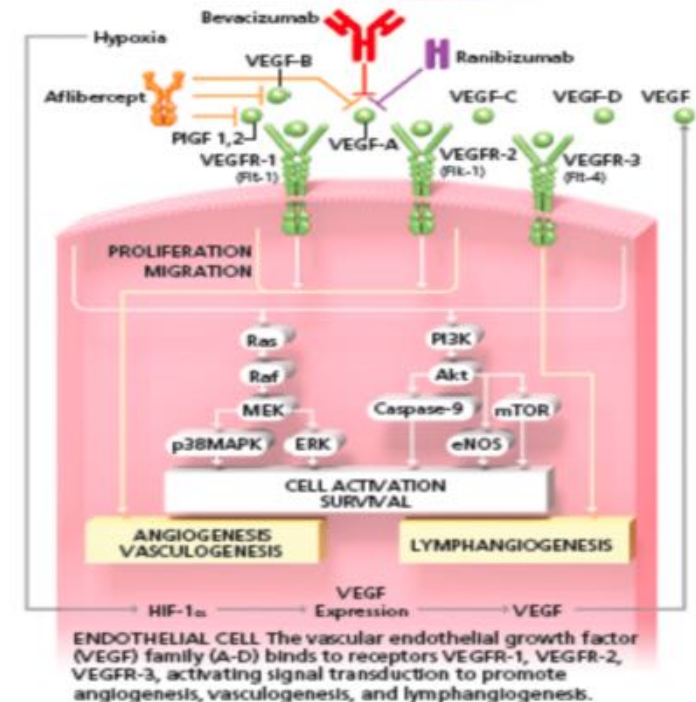
 - Pegaptanib (Macugen, aptamer)**

 - Ranibizumab (Lucentis)**

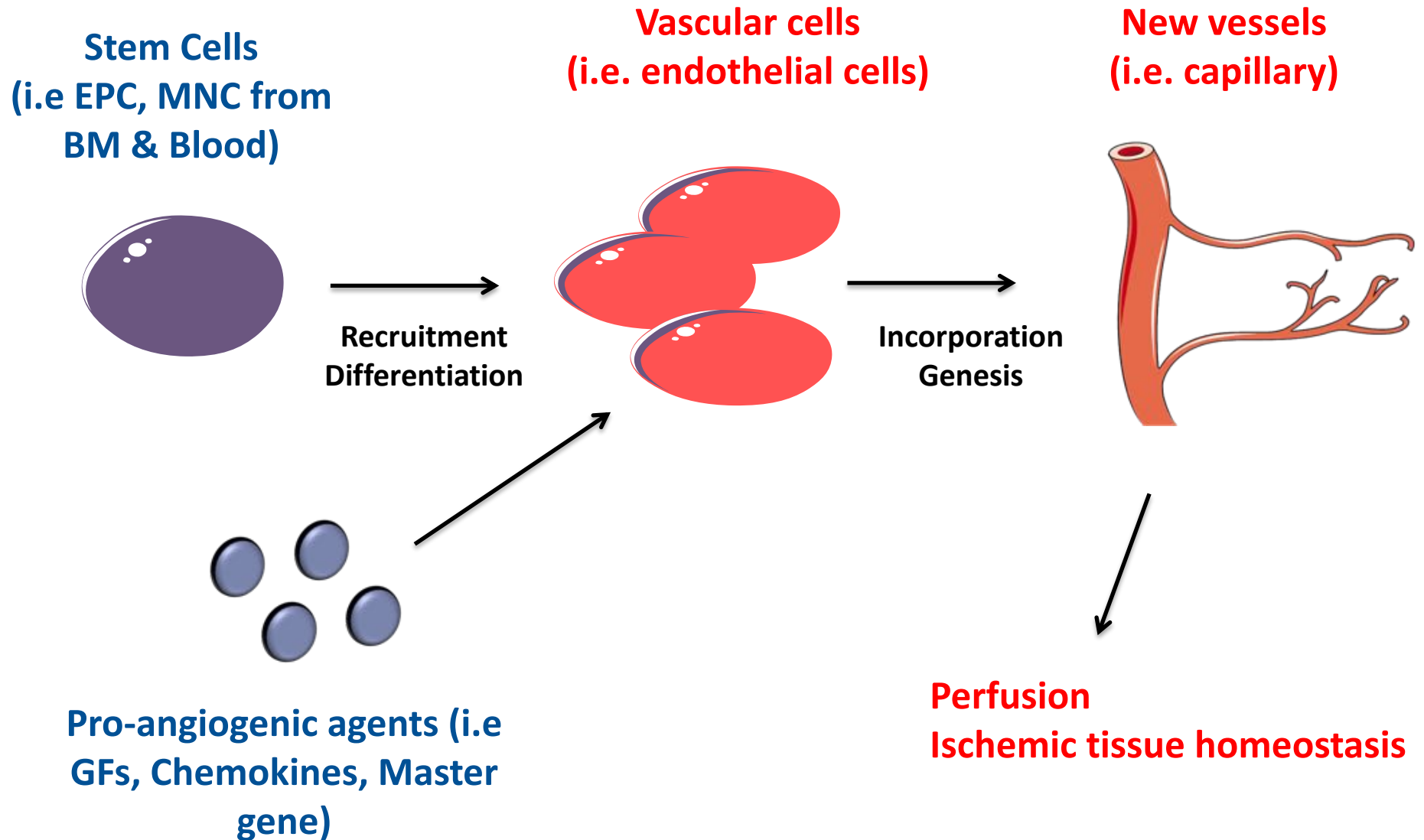
 - Bevacizumab (Avastin)**

 - Aflibercept (Eylea), Conbercept**

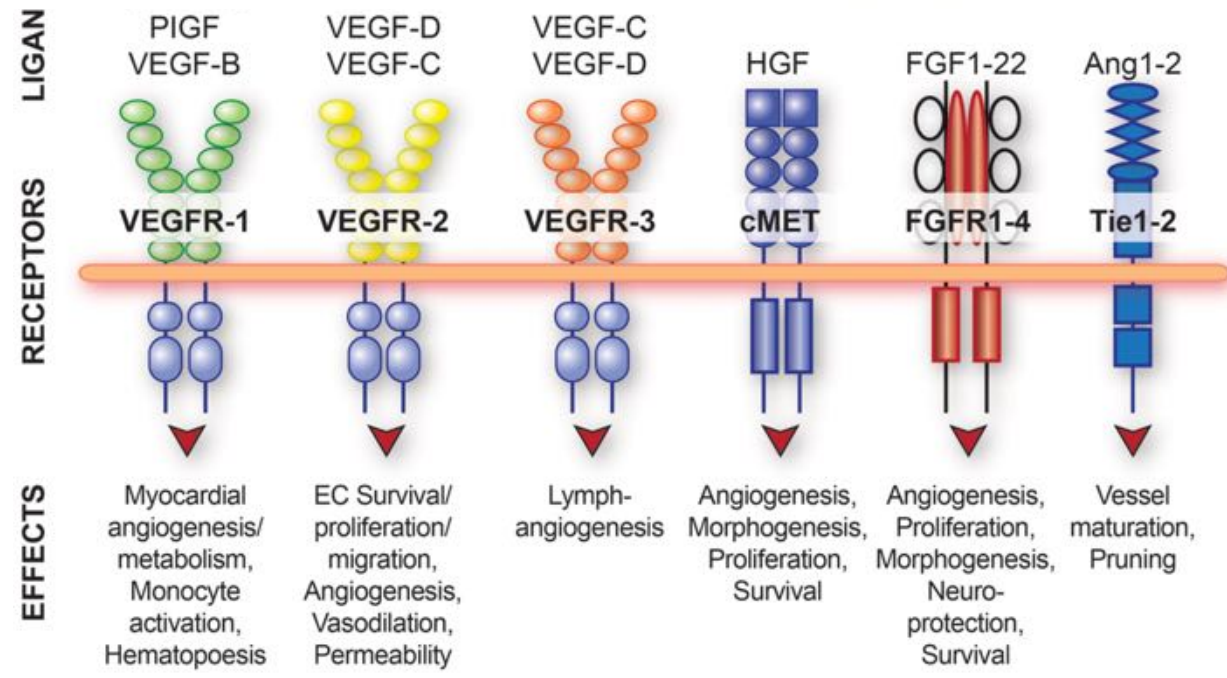
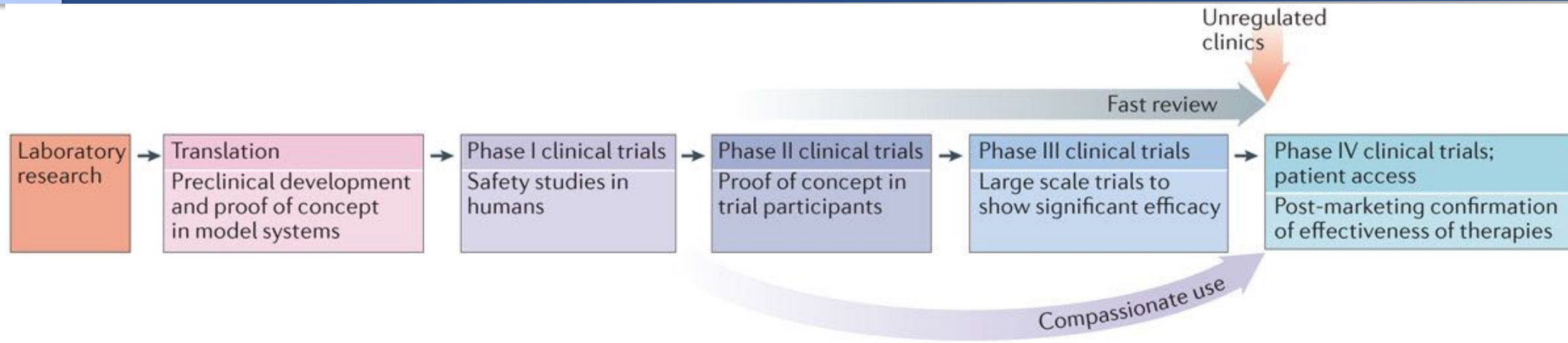
- Intravitreal drug injections are usually performed with laser procedures in order to enhance response to treatment



3- Activation de l'angiogenèse: pathologies ischémiques



3-a Thérapie génique: facteurs de croissance vasculaire

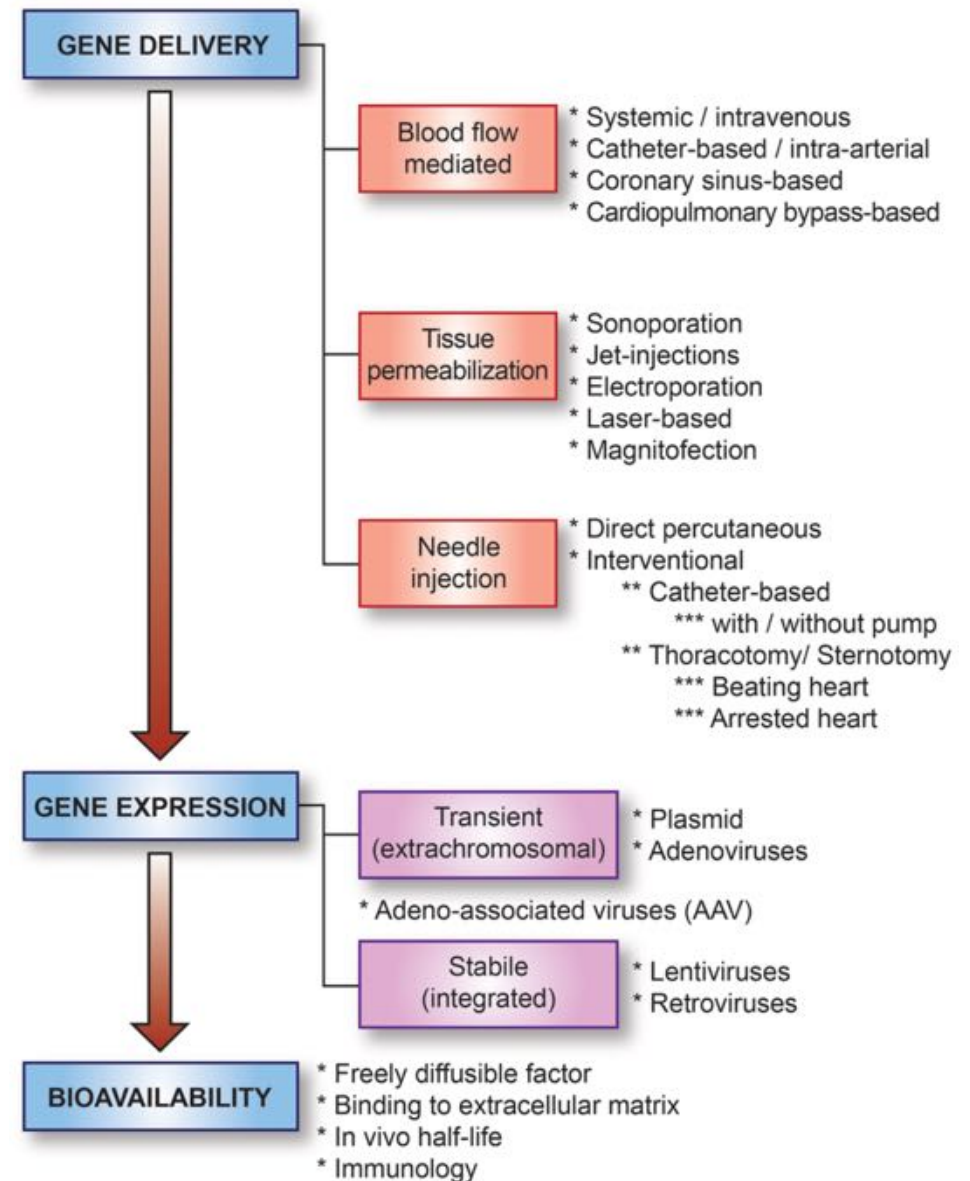


Yla-Herttuala SY et al, Eur Heart J, 2017
 Trounson A, Nat Rev Mol Cell Biol, 2016

3-a Thérapie génique: facteurs de croissance vasculaire

Growth factor	Vectors	Site of injection	Clinical settings	Primary endpoint	References
VEGF	Recombinant protein	Intra-coronary+Intravenous	CHD	Negative	Henry et al. 2003
VEGF165	Adenovirus	Catheter-mediated	CHD	Positive	Hedman et al. 2003
VEGF165	Plasmid	Intramuscular	CLI	Negative	Kusumanto et al. 2006
VEGF165	Plasmid	Catheter-mediated	CHD	Negative	Kastrup et al. 2005
VEGF165	Plasmid	Catheter-mediated	CHD	Negative	Stewart et al. 2009
VEGF121	Adenovirus	Intramuscular	CLI	Negative	Rajagopalan et al. 2003
VEGF121	Adenovirus	Intramuscular	CHD	Negative	Stewart et al. 2006
VEGF121	Adenovirus	Intramuscular	CHD	Negative	Kastrup et al. 2011
VEGF121	Adenovirus	Intramuscular	CLI	Negative	Rajagopalan et al. 2003
FGF-2	Recombinant protein	Intra-coronary	CLI	Positive	Lederman et al. 2003
FGF-2	Recombinant protein	Intra-coronary	CHD	Negative	Simons et al. 2003
FGF-1	Plasmid	Intramuscular	CLI	Positive	Nikol et al. 2008
HGF	Plasmid	Intramuscular	CLI	Positive	Powell et al. 2008
HGF	Plasmid	Intramuscular	CLI	Positive	Shigematsu et al. 2010
HGF	Plasmid	Intramuscular	CLI	Positive	Powell et al. 2010
HGF	Plasmid	Intramuscular	CLI	Positive	Morishita et al. 2011
2 HGF isoforms	Plasmid	Intramuscular	CLI	Positive	Henry et al. 2011
Del-1	Plasmid and poloxamer	Intramuscular	CLI	Negative	Grossman et al. 2007

- Sélection des patients
- Méthodes d'administration du gène
- Vecteurs
- Critères cliniques d'évaluation: Les mesures objectives d'évaluation, telles que la TEP, l'IRM, l'ECG et les ultrasons, devraient être privilégiées par rapport aux mesures subjectives ou non spécifiques, telles que les tests d'effort ou les questionnaires sur la qualité de vie
- Multi-approches?



Bone marrow

Total or MNC,

MSC (CD34-, CD45-, CD19-, CD11a-, CD90+, CD105+, CD73+)

HSC (CD34+, CD117+, CD133+, Lin-),

Angiogenic cells (CD34+, CD133+, CXCR4+ ...),

Side population (CD34-, CD117+, Sca-1+, Hoechst-)

Monocytes (CD14+, CD45+, CXCR2+, CD34-, CD133-, CD144-)

Blood

PB-derived MNC,

Monocytes (CD14+, CD45+, CXCR2+, CXCR3+ CD34-, CD133-, CD144-)

Angiogenic cells (early EPC, CXCR4+, CD133+, CD34+...)

CB-derived MNC, CB-derived EPC (CD34+, CD133+,

VEGFR2+, eNOS, CD144+),

CB-derived SMPC (α-smooth muscle actin, myosin heavy chain, CX3CR1+)

Tissues

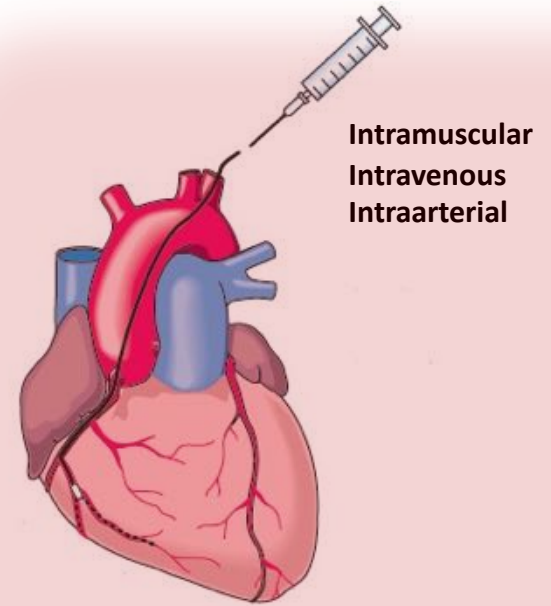
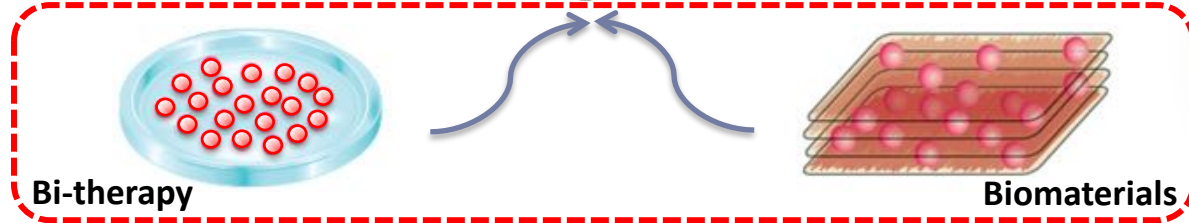
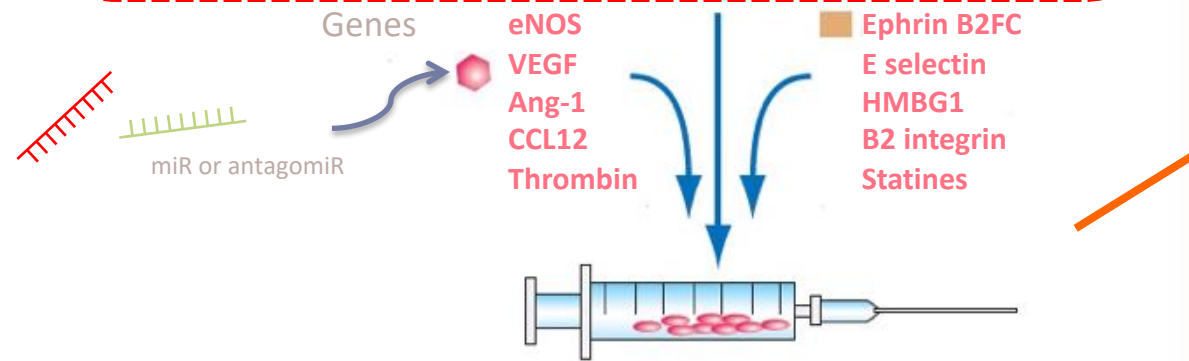
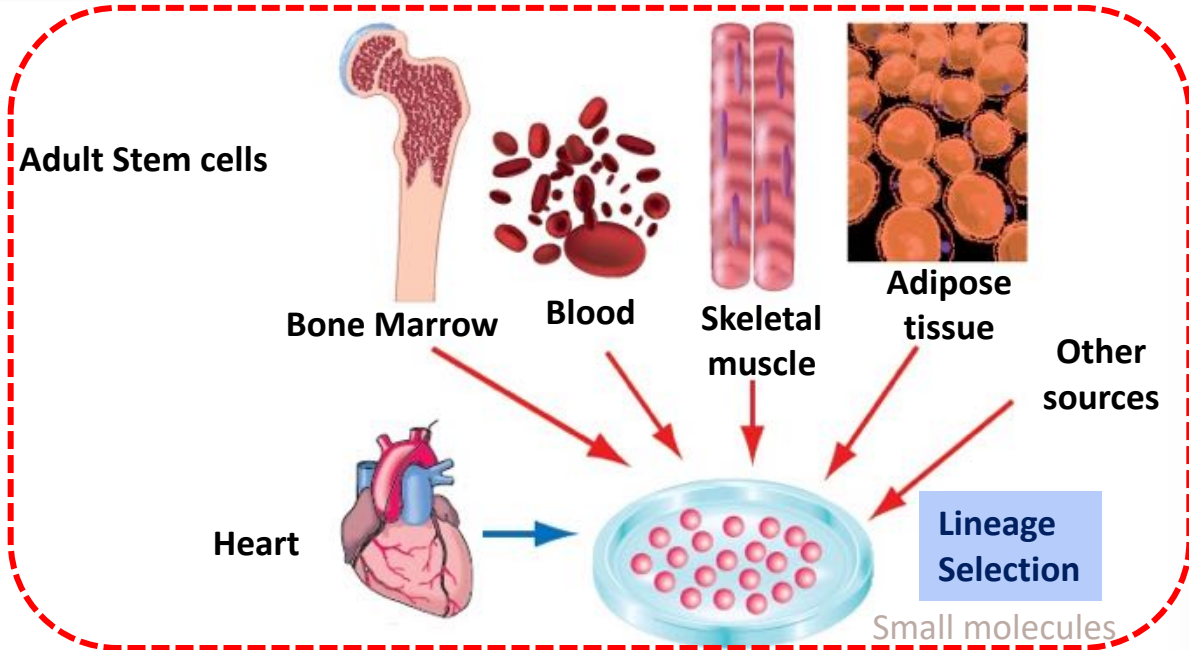
Heart (CD117+, Sca-1+, CD34+, Lin-, cardiosphere),

Vessel wall (CD34-, c-kit+, Sca-1+, Hoechst-),

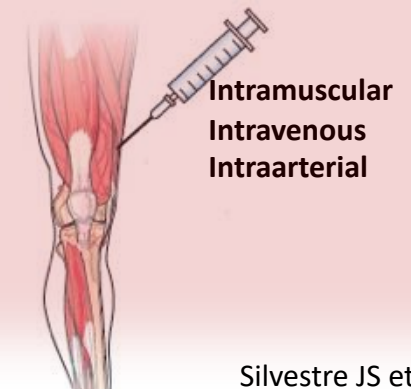
Adipose tissue (SVF: CD34+, CD45^{low}, CD14^{low}, CD13, CD31+; ADSC: CD34+, CD31-, CD45-, CD105+),

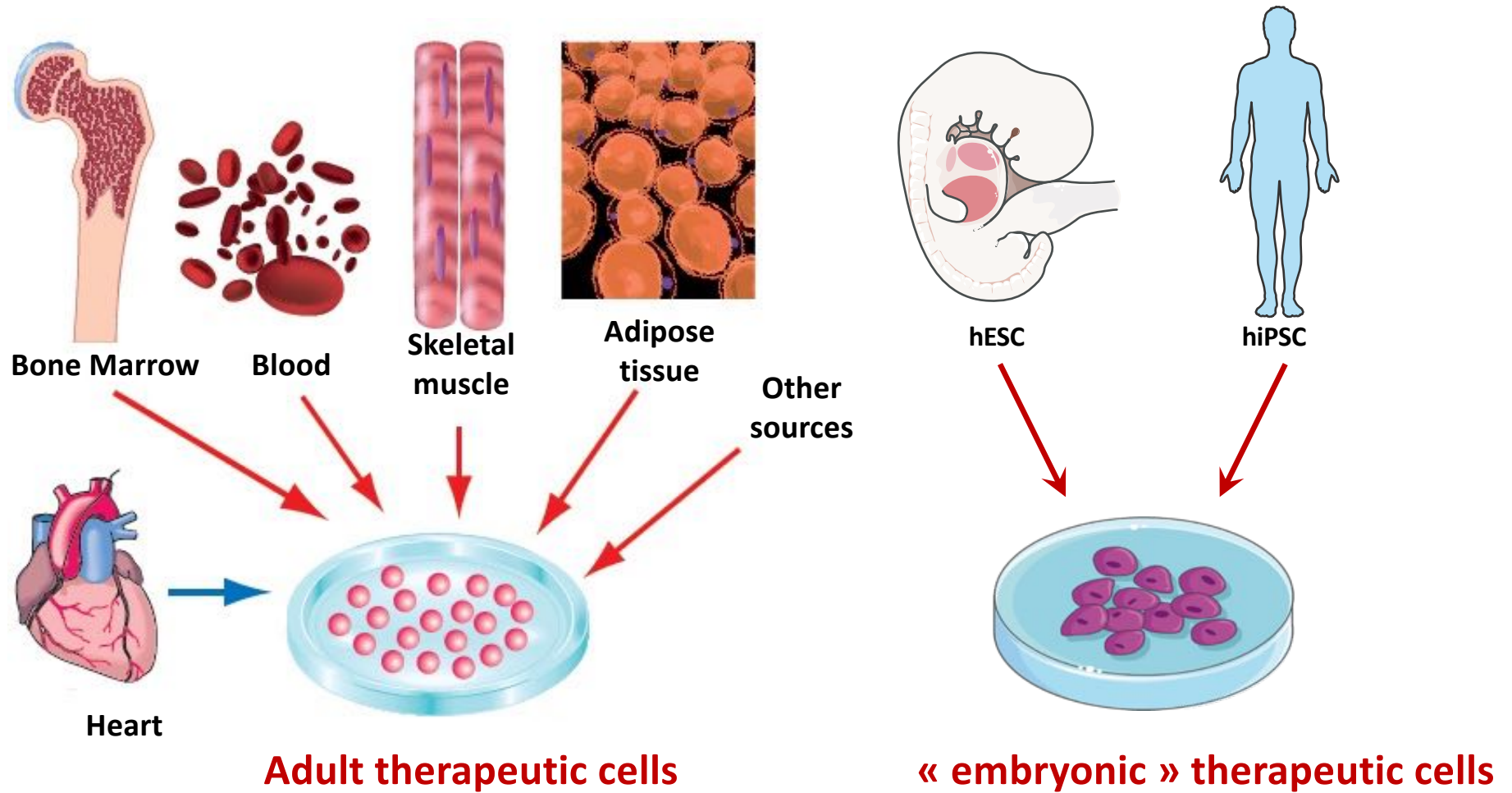
Skeletal muscle (CD34-, CD117+, Sca-1+, Hoechst-)

Stratégies pour augmenter l'efficacité des cellules souches adultes



Treatment of ischemic tissue
Growth Factors
Cytokines





Essais cliniques - Leçons

- 1- Effets pléiotropiques et paracrines**
- 2- Effets locaux et systémiques**
- 3- Origine et types de cellules thérapeutiques**
- 4- Faible efficacité de l'approche autologue**
- 5- Design de l'essai thérapeutique:
Type de cellules? Doses? Timing des injections? Site d'injection?
Groupes contrôles? Critères d'efficacité? Nombre de patients?**